

بسم الله الرحمن الرحيم

جمهوری اسلامی ایران

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد

عنوان پایان نامه:

بررسی تأثیر حمایتی جنسینگ قرمز کره ای بر اثرات جانبی سیپروفلوکساسین بر روی پروستات و
اپی دیدیم موش صحرایی نر عفونی شده با مدل UPEC

استاد راهنما: دکتر رضا شیرازی

اساتید مشاور: دکتر شهرام دارابی

دکتر سعید شکری

دکتر محمود علیپور

نگارش: سیده مریم میری

سال تحصیلی ۱۳۹۴-۱۳۹۳

شماره پایان نامه: ۵۱

تقدیم به پدر و مادر عزیزم

که از نگاهشان صلابت، از رفتارشان محبت و از صبرشان ایستادگی را آموختم
آن دو فرشته‌ای که از خواسته‌هایشان گذشتند، سختی‌ها را به جان خریدند و خود را سپر بلای
مشکلات و ناملایمات کردند تا من به جایگاهی که اکنون در آن ایستاده‌ام برسم .

پروردگارا

نه می‌توانم موهایشان را که در راه عزت من سفید شد، سیاه کنم و نه برای دست‌های پینه بسته‌شان که
ثمره تلاش برای افتخار من است، مرهمی دارم. پس توفیقم ده که هر لحظه شکرگزارشان باشم.

تشر و قدردانی

پس از شکرگزاری به درگاه خداوند متعال، وظیفه خود می‌دانم از زحمات افرادی که در کلیه مراحل این پایان‌نامه اینجانب را یاری فرمودند، تشر و قدردانی نمایم:

استاد راهنمای ارجمند، جناب آقای دکتر رضا شیرازی؛ اساتید مشاور گرامی، جناب آقای دکتر شهرام دارابی، دکتر سعید شکری، دکتر محمود علیپور و کلیه اساتید محترم گروه علوم تشریح و بافت‌شناسی که در دوره کارشناسی ارشد افتخار دانشجویی این عزیزان را داشتم.

همچنین از همه عزیزانی که با کمک‌های خود مرا در تألیف این رساله یاری رساندند سپاسگزارم:

خانم حاجی آقایی، خانم صادقی، آقای توسلی

چکیده

زمینه: عفونت دستگاه ادراری تناسلی یکی از فاکتورهای مهم و تأثیرگذار در ناباروری مردان است. تأثیر عفونت بر ارگان‌های فرعی این دستگاه، منجر به تغییر عملکرد آن‌ها و در نهایت کاهش میزان باروری می‌شود. از سوی دیگر آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در درمان این نوع عفونت نیز دارای اثرات جانبی قابل توجهی است. هدف اصلی در این مطالعه بررسی اثرات محافظتی جنسینگ قرمز کراهی بر عفونت پروستات و اپی‌دیدیم در رت‌های نر درمان شده با سیپروفلوکساسین است.

مواد و روش‌ها: تعداد ۷۲ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار به صورت تصادفی و به شکل زیر به ۹ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل، گروه شم (تزریق نرمال سالین به هر وازدفران و گاوژ PBS از راه دهان)، گروه جنسینگ (تزریق داخل صفاقی با دوز ۱۵۰mg/kg)، گروه سیپروفلوکساسین (دریافت دوز ۱۵۰mg/kg از راه دهان)، گروه سیپروفلوکساسین+جنسینگ، گروه عفونی (عفونت با E.coli)، گروه عفونی+جنسینگ، گروه عفونی+سیپروفلوکساسین، گروه عفونی+سیپروفلوکساسین+جنسینگ. چهارده روز پس از پایان تزریق، رت‌ها بیهوش شده و پروستات و اپی‌دیدیم آن‌ها به منظور انجام مطالعات میکروسکوپی برداشته شد. رنگ‌آمیزی معمول هماتوکسیلین-ئوزین برای بررسی میزان شدت التهاب و تغییرات مورفومتریک و رنگ‌آمیزی اختصاصی TUNEL برای تشخیص میزان آپوپتوز انجام گرفت. در نهایت داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: عفونت باعث کاهش قابل توجه ارتفاع سلول‌ها و قطر توبول‌های اپی‌دیدیم و افزایش معنی‌دار شدت التهاب در پروستات و اپی‌دیدیم نسبت به گروه کنترل شد ($p < 0.05$). همچنین رت‌های گروه عفونی+سیپروفلوکساسین کاهش معنی‌داری در ارتفاع سلول‌ها و قطر توبول‌های اپی‌دیدیم نسبت به گروه کنترل پیدا کردند ولی کاهش معنی‌داری در شدت التهاب نسبت به گروه عفونی نشان ندادند ($p < 0.05$). استفاده از جنسینگ در گروه‌های عفونی تحت درمان با سیپروفلوکساسین، باعث افزایش قابل توجهی در ارتفاع سلول‌های اپی‌تلیوم اپی‌دیدیم و کاهش معنی‌دار شدت التهاب در اپی‌دیدیم و پروستات نسبت به گروه عفونی شد. نتایج بررسی آپوپتوز، نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار میزان آپوپتوز در گروه‌های سیپروفلوکساسین، عفونی و

عفونی+سیپروفلوکساسین نسبت به گروه کنترل بوده است. همچنین کاهش آپتوز در گروه عفونی+سیپروفلوکساسین+جنسینگ نسبت به گروه عفونی معنی دار بوده است ($p<0.05$).
نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان داد که جنسینگ می تواند ماده ای مؤثر در کاهش اثرات جانبی سیپروفلوکساسین در درمان عفونت ارگان های تناسلی فرعی باشد. استفاده ترکیبی از سیپروفلوکساسین و جنسینگ بسیار مؤثرتر از استعمال هر کدام از آنها به تنهایی است.
کلیدواژه ها: پروستات، اپی دیدیم، عفونت، سیپروفلوکساسین، جنسینگ

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
چکیده فارسی	۱

فصل اول: مقدمه

۱-۱- مقدمه و اهمیت موضوع	۸
۲-۱- کلیات	۱۰
۱-۲-۱- عفونت دستگاه تناسلی مردان و ناباروری	۱۰
۲-۲-۱- استرس اکسیداتیو و ناباروری	۱۳
۳-۲-۱- آپوپتوز	۱۴
۴-۲-۱- مسیرهای آپوپتوزی	۱۵
۵-۲-۱- روش‌های بررسی آپوپتوز	۱۷
۶-۲-۱- استفاده از آنتی اکسیدان‌ها در درمان ناباروری مردان	۱۹
۷-۲-۱- جنسینگ	۲۰
۸-۲-۱- مروری بر آناتومی و بافت شناسی دستگاه تولیدمثل مذکر	۲۲
۳-۱- اهداف و فرضیات	۲۸

فصل دوم: مروری بر متون

۱-۲- بررسی متون	۳۱
-----------------	----

فصل سوم : مواد و روش‌ها

۱-۳- گروه بندی حیوانات	۳۹
۲-۳- روش عفونی کردن حیوان	۴۰
۳-۳- روش آماده‌سازی جنسینگ	۴۱
۴-۳- تشریح و نمونه برداری	۴۱
۵-۳- تهیه محلول‌های مورد نیاز به منظور بررسی مورفومتری	۴۲
۶-۳- مراحل آماده سازی بافت جهت مطالعه با میکروسکوپ نوری	۴۳
۷-۳- بررسی مورفومتریک	۴۷
۸-۳- رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی	۴۸

۳-۹- آنالیز آماری ----- ۵۱

فصل چهارم : نتایج و یافته‌ها

۴-۱- نتایج مربوط به مورفولوژی توبول‌های اپی‌دیدیم (ارتفاع سلول‌های اپی‌تلیال، قطر توبول‌ها و بررسی استریوسیلیاها) - ۵۳

۴-۲- نتایج مربوط به بررسی شدت التهاب در اپی‌دیدیم (ادم بافت بینابینی و انفیلتراسیون سلول‌های التهابی به فضای مابین توبول‌های اپی‌دیدیم) ----- ۵۶

۴-۳- نتایج مربوط به بررسی شدت التهاب در پروستات (چروکیدگی آسینی‌ها و انفیلتراسیون سلول‌های التهابی به فضای مابین آسینی‌ها) ----- ۵۸

۴-۴- نتایج مربوط به میزان آپوپتوز در اپی‌تلیوم اپی‌دیدیم و پروستات ----- ۶۱

فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری

۵-۱- بحث مربوط به تغییرات مورفومتریکی و شدت التهاب در اپی‌دیدیم ----- ۶۵

۵-۲- بحث مربوط به تغییرات مورفومتریکی پروستات ----- ۶۸

۵-۳- بحث مربوط به تغییرات آپوپتوتیک در پروستات و اپی‌دیدیم ----- ۷۱

۵-۴- نتیجه‌گیری کلی ----- ۷۳

۵-۵- پیشنهادات ----- ۷۴

فصل ششم: منابع ----- ۷۵

چکیده انگلیسی ----- ۸۰

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول شماره ۳-۱: اندازه‌گیری شدت التهاب در بافت پروستات	۴۸
جدول شماره ۴-۱: میانگین ارتفاع اپی‌تلیوم و قطر توبول اپی‌دیدیم در گروه‌های مورد مطالعه	۵۴
جدول شماره ۴-۲: میزان ادم بافت بینابینی و انفیلتراسیون سلول‌های التهابی به فضای مابین توبول‌های اپی‌دیدیم در گروه‌های مورد مطالعه	۵۷
جدول شماره ۴-۳: شدت تغییرات آسینی‌ها و انفیلتراسیون سلول‌های التهابی به فضای مابین آسینی‌های پروستات در گروه‌های مورد مطالعه	۵۹
جدول شماره ۴-۴: میزان آپوپتوز سلول‌های اپی‌تلیال اپی‌تلیوم اپی‌دیدیم و پروستات در گروه‌های مورد مطالعه	۵۹

صفحه	عنوان
۱۶	شکل ۱-۱: فرآیند آپتوز
۲۰	شکل ۲-۱: عوامل به وجود آورنده ی شرایط استرس اکسیداتیو
۲۱	شکل ۳-۱: جنسینگ آسیایی
۲۴	شکل ۴-۱: توبول‌های اپی دیدیم
۲۴	شکل ۵-۱: بخش‌های مختلف اپی دیدیم
۲۷	شکل ۶-۱: نمای ماکروسکوپی غده پروستات موش صحرایی
۵۴	شکل ۱-۴: تصاویر میکروسکوپی از اپی دیدیم موش صحرایی
۵۵	شکل ۲-۴: قطر و ارتفاع اپی تلیوم در سر اپی دیدیم موش صحرایی
۵۷	شکل ۳-۴: فاصله بین توبول‌های اپی دیدیم موش صحرایی در گروه‌های مختلف
۶۰	شکل ۴-۴: شدت‌های مختلف التهاب در پروستات موش صحرایی گروه‌های مورد مطالعه
۶۲	شکل ۵-۴: تصاویر میکروسکوپی از سلول‌های اپی تلیال اپی دیدیم پس از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی (TUNEL) --
۶۳	شکل ۶-۴: تصاویر میکروسکوپی از سلول‌های اپی تلیال پروستات پس از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی (TUNEL) -

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه و اهمیت موضوع:

علی‌رغم گسترش و پیشرفت دانش پزشکی، نازایی و ناباروری یک معزل مهم در زندگی حدود ۱۵ درصد از زوجها است. امروزه در اکثر نقاط دنیا و بیمارستان‌های تخصصی زنان، مراکز ناباروری دایر شده است. این مسئله نشان می‌دهد که علی‌رغم گسترش روزافزون دانش پزشکی هنوز حل معضل ناباروری یک ضرورت است. در میان عوامل متعدد ناباروری، بیش از ۵۰ درصد ناباروری‌ها مربوط به فاکتورهای مردانه می‌باشد (۱).

بر اساس مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته است، عفونت‌های باکتریایی و پاسخ‌های متعاقب سیستم ایمنی یکی از عوامل مهم ایجاد ناباروری در مردان می‌باشد. عامل حدود ۷۰ درصد از عفونت‌های دستگاه ادراری تناسلی *uropathogenic Escherichia coli* (UPEC) است. این عفونت‌ها بر قسمت‌های مختلف سیستم تولیدمثل مردان مثل بیضه‌ها، اپی‌دیدیم و غدد تناسلی ضمیمه اثر می‌گذارند و می‌توانند در مراحل مختلف تکامل، بلوغ و انتقال، بر کیفیت اسپرم‌ها اثرات سوء بر جای گذاشته و از این طریق منجر به کاهش توانایی باروری شوند. عفونت‌های باکتریایی منجر به افزایش حضور لکوسیت‌ها در مایع منی می‌شوند و این لکوسیت‌ها با آزادسازی مقادیر زیاد گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS)، باعث کاهش تحرک و افزایش مرگ‌ومیر و آسیب به اسپرم‌ها می‌شوند. از طرفی استفاده از آنتی‌بیوتیک معمول و رایج در درمان این نوع از عفونت‌ها (سیپروفلوکساسین) خود می‌تواند باعث القای آپوپتوز از طریق افزایش تولید رادیکال‌های آزاد شود. بنابراین، درمان هم‌زمان با آنتی‌بیوتیک‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند استراتژی مناسبی برای درمان ناباروری مردان در اثر عفونت باکتریایی باشد (۱, ۲).

آنتی‌اکسیدان‌ها مولکول‌هایی هستند که نقش مهمی در جلوگیری از تولید و فعالیت رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کنند. آن‌ها با متعادل کردن میزان رادیکال‌های آزاد، می‌توانند مانع از آسیب بافتی ناشی از آنتی‌بیوتیک‌ها

شوند. جنسینگ کره‌ای، آنتی‌اکسیدانی قوی و بسیار پرکاربرد در آسیا است. مطالعات پیشنهاد کرده‌اند که جنسینگ، استرس بیولوژیکی، شیمیایی و فیزیکی را کاهش می‌دهد و در کل باعث سرزندگی و افزایش عملکرد ایمنی، ظرفیت فیزیکی و ذهنی می‌شود (۳). هرچند در مطالعات گذشته اثرات دارو بر روی عملکرد بیضه، ریه، قلب و کلیه بررسی شده است (۴) اما شواهد نشان می‌دهند که مطالعه‌ای بر روی اثرات محافظتی جنسینگ قرمز کره‌ای بر تغییرات آپوپتوزیس در اپی‌دیدیم و پروستات انجام نشده است.

بنابراین با توجه به اثرات زیان‌بار ناشی از عفونت E.Coli بر دستگاه تناسلی مردانه، همچنین تأثیر سوء عوامل درمانی مانند آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بر ارگان‌های تناسلی و اهمیت این موضوع در رابطه با ناباروری مردان، مطالعه حاضر به بررسی اثرات حمایتی جنسینگ بر اثرات جانبی سیپروفلوکساسین بر روی ارگان‌های تناسلی ضمیمه (پروستات و اپی‌دیدیم) پرداخته است.

۱-۲- کلیات

۱-۲-۱- عفونت دستگاه تناسلی مردان و ناباروری

ناباروری یکی از مشکلات مهم در زندگی حدود ۱۵ درصد از زوج‌هاست. این درحالی است که تقریباً ۶۰ درصد از موارد ناباروری مربوط به مرد و باقی موارد مربوط به زن یا هر دو است. از عوامل عمده مربوط به مردان می‌توان به آسیب‌های اندام تناسلی، عفونت‌های مایع منی، بیضه‌ها، مجاری تناسلی و غدد تناسلی ضمیمه، واریکوسل، انسداد مجاری تناسلی، بیماری‌های اندوکراین و متابولیک اشاره نمود (۱).

از میان عوامل متعدد نازایی مردان، عفونت دستگاه ادراری تناسلی یکی از عوامل بسیار مهم در سطح جهانی است. عفونت ارگان‌های تناسلی و التهاب حدود ۳۵ درصد از موارد ناباروری مردان را به خود اختصاص داده است. این عامل نه تنها بر عملکرد اسپرم‌ها اثر می‌گذارد بلکه کل روند اسپرماتوژنیز را تحت تأثیر خود قرار می‌دهد (۵). بعضی از مطالعات نشان داده‌اند که عفونت مجاری تناسلی، منجر به انسداد نسبی مجاری منی‌ساز می‌شود و حالات شدید الیگوزواسپرمیا (oligozoospermia) را ایجاد می‌نماید. از سوی دیگر، انسداد این مجاری باعث اختلال در عملکرد غدد تناسلی ضمیمه می‌شود و بدین طریق موجب تغییر در ترکیب و غلظت مواد تشکیل دهنده منی می‌گردد (۱).

مهم‌ترین عوامل پاتوژن در دستگاه تناسلی، ای کولای (E.Coli) به میزان ۷۰ تا ۹۵ درصد و استافیلوکوکوس ساپروفیتوکوس به میزان ۵ درصد می‌باشد (۶، ۷). E.Coli شایع‌ترین عامل ایجاد کننده اپی‌دیدیمیت- اورکیت منتقل شونده از طریق غیرجنسی است و در ۶۵ تا ۸۰ درصد موارد حاد یا مزمن پروستاتیت نقش دارد. E.coli

سویه‌های متفاوتی دارد که هر کدام می‌توانند طیف وسیعی از بیماری‌ها را ایجاد کنند. آن سویه از E.Coli که شایع‌ترین عامل UTI (عفونت دستگاه ادراری) می‌باشد، UPEC (Uropathogenic E.coli) نام دارد (۸).

بررسی ترکیب مایع منی نشان داده است که عفونت مجاری تناسلی باعث کاهش معنی‌دار غلظت گلیسروفسفوکولین، ال-کارنیتین و اسیدسیتریک در مایع منی می‌شود. عفونت‌های باکتریایی منجر به افزایش حضور لکوسیت‌ها در مایع منی شده و این لکوسیت‌ها با آزادسازی مقادیر زیاد گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS) باعث از بین رفتن تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی اکسیدان‌ها می‌شوند. جهت درمان این بیماری‌های عفونی، آنتی‌بیوتیک‌ها کاربرد مهمی دارند (۹، ۱۰).

باتوجه به گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO)، حدود یک سوم از مردم کره زمین از بیماری‌های عفونی رنج می‌برند و این افراد دسته‌ای از مبتلایان به بیماری‌های سل و بروسلوز و بیماری‌های مقاربتی عفونی مزمن ناحیه ادراری تناسلی، هستند که جهت درمان، نیاز به مصرف دراز مدت آنتی بیوتیک‌ها دارند که گاهی در حدود ۴۰ تا ۶۰ روز این تجویز دارو ادامه دارد و باتوجه به این که طول دوره درمانی با طول دوره اسپرماتوژنز که در انسان 64 ± 8 روز و در موش صحرایی 48 ± 5 روز می‌باشد مطابقت می‌کند، مصرف این داروها ممکن است دارای اثراتی سوء در باروری مردان باشد (۲).

آنتی بیوتیک‌ها ترکیبات مصنوعی یا طبیعی با اثرات انتخابی ضد باکتریایی یا باکتریواستاتیک هستند که عوامل پاتوژن را حذف نموده یا رشدشان را آهسته می‌نمایند. مکانیسم عمل آنتی‌بیوتیک‌ها از طریق عوامل آسیب رساننده به DNA، مهار کننده‌ی سنتز پروتئین و سنتز دیواره سلولی و مهار کننده‌های متابولیکی می‌باشد (۱۱).

یکی از آنتی‌بیوتیک‌هایی که به صورت معمول در درمان عفونت‌های دستگاه ادراری تناسلی استفاده می‌شود سیپروفلوکساسین (ciprofloxacin) است. این ماده از خانواده فلوروکوینولون‌هاست و طیف اثر وسیعی در برابر باکتری‌ها دارد. این ماده به خوبی از راه دهان جذب می‌شود (۱۲). مکانیسم عمل آن شامل بلوکه کردن سنتز DNA باکتریایی از طریق مهار آنزیم توپوایزومراز II باکتریایی (DNA Gyrase) و توپوایزومراز IV است. مهار توپوایزومراز IV مانع از جداسازی کروموزوم‌های همانندسازی شده و انتقال آن‌ها به سلول‌های دختر در طی روند تقسیم سلولی می‌شود. همچنین سیپروفلوکساسین رشد سلولی را مهار و آپوپتوز را در برخی از سلول‌های یوکاریوتی القا می‌کند. این دارو در درمان عفونت‌های داخل سلولی مثل لیستریومونوسایتوز، استافیلوکوک آرئوس، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و عفونت‌های حاصله از باکتری‌های گرم منفی در دستگاه ادراری تناسلی، عفونت‌های حاصله توسط مایکوپلازماها، کلامیدیاها و استرپتوکوک‌ها بسیار مؤثر است. مطالعات genotoxicity در محیط in vivo و in vitro، سیپروفلوکساسین را به عنوان یک داروی بی‌خطر در کاربردهای درمانی پیشنهاد می‌کنند اما گزارش‌ها نشان داده‌اند که سیپروفلوکساسین عملکرد بیضه را در حیوانات مختل می‌کند همچنین تحقیقات نشان داده‌اند که تزریق این دارو به رت‌ها با دوز ۴.۵ و ۹ میلی‌گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن به مدت ۷ و ۶۵ روز به طور قابل توجهی حرکت اسپرم‌ها، وزن بیضه، غدد سمینال و زیکل و پروستات را کاهش می‌دهد. سیپروفلوکساسین می‌تواند به مایع منی انتقال داده شود و می‌تواند به صورت مستقیم بر سلول‌های اسپرم اثر بگذارد که به دنبال آن تغییرات فیزیولوژیکی، متابولیکی و یا ژنتیکی در این سلول‌ها به وجود خواهد آمد. همچنین بر اساس مطالعات انجام گرفته، سیپروفلوکساسین با افزایش تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS) باعث به وجود آمدن شرایط استرس اکسیداتیو و در نهایت افزایش میزان آپوپتوز می‌شود (۱۲، ۱۳).

اکسیژن نقش اصلی را در چرخه‌ی انرژی موجودات زنده ایفا نموده و برای تنفس هوازی در سلول‌ها و بافت‌ها ضروری است. واکنشی که منجر به گرفتن الکترون می‌شود را احیا و واکنشی که منجر به از دست دادن الکترون می‌شود را واکنش اکسیداسیون می‌نامند. مفاهیم اکسیداسیون-احیا بر اساس وقایع انتقال الکترون صورت می‌گیرند. هنگامی که اکسیژن الکترون خود را از دست می‌دهد، ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌نماید. ROS (reactive oxygen species)، مولکول‌های کوچک بسیار فعال و با نیمه عمر کوتاه می‌باشند که در اثر احیاء ناکامل اکسیژن ایجاد شده و شامل رادیکال‌های آزادی مانند سوپراکسید، هیدروکسیل و همچنین پراکسیدهایی همانند پراکسید هیدروژن می‌باشند (۱۴). رادیکال‌های آزاد گروهی از مولکول‌های شیمیایی با یک یا چند الکترون جفت نشده هستند که می‌توانند طی روند اکسیداسیون مولکول‌های زیستی را تغییر دهند. این مولکول‌ها می‌توانند بلافاصله هر ماده‌ای که در اطراف آن‌ها وجود دارد را تحت تأثیر قرار داده و بدین ترتیب زنجیره‌ای از واکنش‌ها را که در نهایت منجر به آسیب سلولی می‌شود به راه بیندازند. رادیکال‌های آزادی چون سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل و هیدروژن پراکسید بیشترین گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن موجود در پلاسمای مایع منی هستند (۱۵).

مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که ROS با بیماری‌هایی مثل سرطان، بیماری‌های قلبی-عروقی، نوروپاتی دیابتی و حتی با فرآیندهایی نظیر پیری و ناباروری نیز ارتباط دارد. اما از آغاز دهه ۱۹۹۰ بود که محققان دریافتند سلول‌ها برای کنترل فعالیت‌های فیزیولوژیک خود مقادیر کم و کنترل شده ROS را تولید می‌کنند و حتی نشان داده شده است که ROS ها به عنوان پیک ثانویه نقش مثبتی در تنظیم فعالیت سلول‌ها دارند و در واقع غلظت‌های فیزیولوژیک آن‌ها برای عملکرد طبیعی سلول لازم و ضروری است. مطالعات نشان داده‌اند که

در بیشتر سلول‌ها، مقادیر فیزیولوژیک ROS توسط آنزیم‌های خانواده NADPH اکسیداز (NOX) تولید می‌شود. این آنزیم‌ها در غشاء پلاسمایی سلول‌ها حضور دارند و با اتصال کلسیم به آن‌ها، تولید ROS را افزایش می‌دهند (۱۶).

اثرات مضر ROS در شرایطی که به آن استرس اکسیداتیو اطلاق می‌شود، ظاهر می‌گردد. استرس اکسیداتیو به معنای از بین رفتن تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی اکسیدان‌ها و افزایش مقدار اکسیدان‌ها است. از جمله این اثرات مضر می‌توان به ایجاد مرگ سلولی در سلول‌های سالم (آپوپتوز)، افزایش تولید سیتوکین‌های التهابی، فعال‌سازی ژن‌ها، شکستن DNA، غیرفعال کردن پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، اکسید کردن قندها و چربی‌ها به خصوص اسیدهای چرب غیراشباع و لیوپروتئین‌های غشاء سلولی اشاره کرد.

۱-۲-۳- آپوپتوز

آپوپتوز اولین بار در سال ۱۹۷۲ میلادی توسط محققى به نام Kerr شناخته شد. این واژه ریشه یونانی دارد و به معنای افتادن برگ از درخت است (۱۷).

آپوپتوز مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول‌های پیر، آسیب دیده، اضافی و مضر می‌شود و برای تکامل و هموستاز بافتی ضروری است. شکل‌گیری اندام‌ها و بافت‌های بدن انسان در دوره‌ی جنینی و کنترل میزان رشد و تکثیر سلول‌های بدن همگی از نتایج این پدیده زیستی است. به عنوان مثال، وقوع پدیده آپوپتوز در سلول‌های جنین انسان باعث جدا شدن انگشتان دست از هم می‌شود. سیستم ایمنی با به کارگیری این فرآیند بسیاری از اعمال ضد آنتی ژنی خود را انجام می‌دهد. حذف سلول‌های آلوده، حذف کلون‌های B و T فعال شده بر علیه آنتی ژن‌های خودی و به طبع آن جلوگیری از بروز بیماری‌های

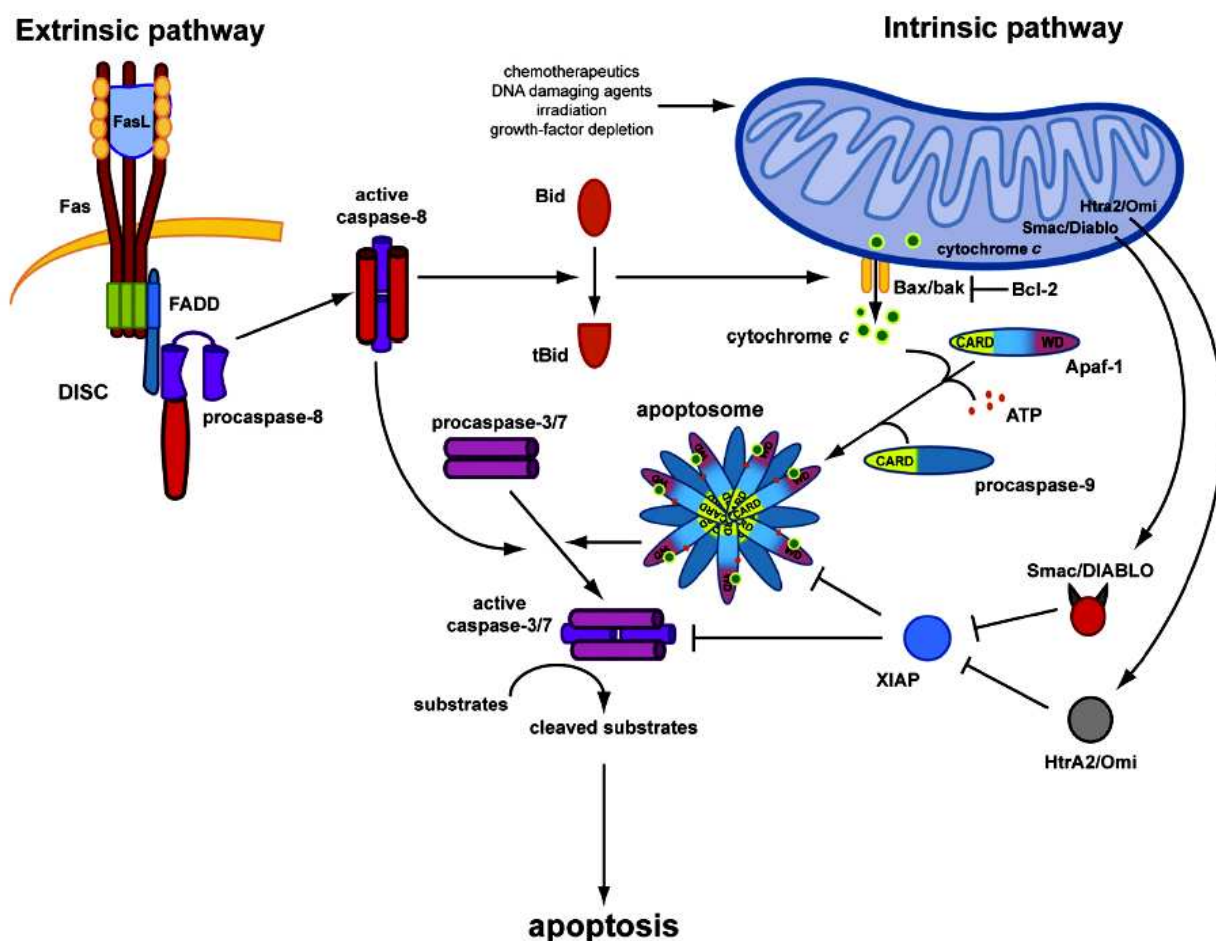
اتوایمئون از نتایج به کارگیری فرایند آپوپتوز هستند. هرگونه اختلال در روند آپوپتوز، منجر به بیماری‌هایی می‌شود که می‌تواند ناشی از کاهش مرگ سلولی باشد و منجر به ایجاد و رشد سلول‌های سرطانی و یا اختلالات خودایمونی گردد. بالعکس افزایش غیر طبیعی مرگ سلولی در بیماری‌هایی نظیر اختلالات نورو دژنراتیو و ایدز دیده می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند هر عاملی که از رشد و تکامل طبیعی سلول‌ها جلوگیری کند، مانند قرارگیری در معرض عوامل توکسیک یا انجماد، ممکن است زمینه را برای بروز آپوپتوز در آن‌ها فراهم کند (۱۸، ۱۹).

سلول‌هایی که متحمل مرگ آپوپتوزی می‌شوند تغییرات مورفولوژیک متعددی نشان می‌دهند که عبارتند از: کوچک و جمع شدن سلول، تراکم کروماتین، از هم گسیختگی سازماندهی شده هسته، جوانه زدن غشای پلاسمایی و سرانجام قطعه قطعه شدن سلول و ایجاد اجسام آپوپتوزی که به سرعت بلعیده می‌شوند. بطور کلی، مسیرهای درگیر در تحریک فرایند آپوپتوز را به دو دسته تقسیم می‌کنند: ۱- مسیر خارجی (یا مسیر رسپتورهای مرگ) که این مسیر بدنبال لیگاندپوشی رسپتورهای خانواده TNF آغاز شده و منجر به فعال‌سازی کاسپاز ۸ و متعاقباً کاسپاز ۳ می‌گردد، ۲- مسیر داخلی (یا مسیر میتوکندریایی) که بوسیله اعضای خانواده BCL-۲ کنترل می‌شود (شکل ۱-۱) (۲۰).

۱-۲-۴- مسیرهای آپوپتوزی:

۱- مسیر خارجی: در غشای پلاسمایی اغلب سلول‌ها گیرنده‌های مرگ وجود دارد. گیرنده‌های مرگ، اعضا ابر خانوادگی گیرنده‌ی فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF) می‌باشند. زمانی که این گیرنده‌ها توسط لیگاندهای مربوطه تحریک شوند، سبب فعال شدن کاسپازها و القاء آپوپتوز می‌گردند. ویژگی

ابرخانواده وجود توالی غنی از سیستئین در بخش خارج سلولی است. این گیرنده‌ها در بخش سیتوپلاسمی خود، دارای توالی به نام ناحیه مرگ (Death Domain) بوده و از این‌رو در انتقال پیام آپتوزی به درون سلول شرکت می‌نمایند. تحریک گیرنده‌های مرگ توسط لیگاندهای مربوط، منجر به تریمریزاسیون گیرنده و به کارگیری پروتئین‌های آداپتور می‌گردد. واکنش‌های بعدی این پروتئین‌ها منجر به فعال شدن کاسپازهای آغازگر (کاسپاز ۸ و ۱۰) و سپس کاسپازهای اجرایی (کاسپازهای ۳، ۶ و ۷) می‌شود.



شکل ۱-۱: فرآیند آپتوز. تصویر بالا نشان دهنده مسیر داخلی و خارجی آپتوز در سلول می‌باشد.

۲- مسیر داخلی: در مسیر داخلی یا میتوکندریایی، سیتوکروم c از فضای بین دو غشای میتوکندری به داخل سیتوپلاسم آزاد می‌شود. سیتوکروم c با Apaf-1 ، ATP و پروکاسپاز-۹ تعامل کرده و آپوپتوزوم ایجاد می‌شود. آپوپتوزوم سبب فعال شدن کاسپاز-۹ شده و به دنبال آن کاسپازهای اجرایی فعال می‌شوند (۲۱).

۱-۲-۵- روش‌های بررسی آپوپتوز:

از آنجایی که آپوپتوزیس برخلاف مرگ سلولی به روش نکروز با واکنش‌های التهابی مانند تورم، قرمزی، درد و غیره همراه نیست و علاوه بر این اجسام آپوپتوتیک به سرعت توسط سلول‌های فاگوسیت کننده برداشته می‌شوند، بنابراین در حالت عادی نمی‌توان به کمک میکروسکوپ نوری سلول‌های مذکور را شناسایی و محاسبه کرد و راه‌های شناسایی خاصی برای این کار وجود دارد که با توجه به بافت خاص و اطلاعات مورد نظر می‌توان یکی از تکنیک‌های اختصاصی را به کار گرفت. برخی از این تکنیک‌ها عبارتند از میکروسکوپ الکترونی، روش ISEL، اندازه‌گیری فعالیت کاسپازها، فلوسیتومتری و رنگ‌آمیزی TUNEL.

- میکروسکوپ الکترونی: تغییرات مورفولوژیکی که در سلول‌های آپوپتوتیک ایجاد می‌شود با نکروز متفاوت است. اولین بار تغییرات مورفولوژیکی در سلول‌های آپوپتوتیک با میکروسکوپ الکترونی مشاهده شد. این روش، تست استاندارد طلایی برای تمایز آپوپتوز از نکروز است ولی این روش نیازمند مهارت‌های بسیار است. علاوه بر آن قادر به شناسایی نمونه‌های متعددی نیست چرا که تنها محدوده‌ی کوچکی از نمونه، قابل بررسی می‌باشد. همچنین ارزیابی‌های کمی دامنه آپوپتوزیس، توسط میکروسکوپ الکترونی مشکل است.

- روش ISEL (In Situ End-labeling Technique) : در این روش به جای TdT به کار رفته در رنگ آمیزی تانل، از DNA پلی مرز I استفاده می شود. این روش در مقایسه با روش تانل حساسیت کمتری دارد و وقت گیر است.
- اندازه گیری فعالیت کاسپازها: کاسپازها جز خانواده سیستئین پروتئازها هستند و نقش محوری در شروع و فاز اجرایی آپوپتوز ایفا می نمایند. در روند آپوپتوز، کاسپازها فعال شده و روی سوبستراهای خود عمل کرده و سبب تغییرات بیوشیمیایی و مورفولوژیک در سلول های آپوپتوتیک می شوند. بنابراین ارزیابی فعالیت کاسپازها به عنوان یک مارکر بیوشیمیایی آپوپتوز مطرح است. به علاوه با بررسی فعالیت کاسپازها می توان مسیر آپوپتوز (خارجی و داخلی) را ارزیابی کرد. بررسی فعالیت کاسپازها با استفاده از سوبسترای اختصاصی آنها صورت می گیرد.
- فلوسیتومتری: اساس این روش بر این مبنا استوار است که در طی مراحل اولیه آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین که به طور طبیعی در نیمه داخلی غشاء وجود دارد به نیمه خارجی غشاء منتقل می شود. قرار گرفتن این فسفولیپید در لایه خارجی غشای سلولی باعث شناسایی و فاگوسیت شدن سلول آپوپتوتیک توسط ماکروفاژها و سلول های مجاور می شود. مشخص شده است که آنکسین V که یک پروتئین ضد انعقادی و دارای وزن مولکولی ۳۵ کیلودالتون است در حضور کلسیم با تمایل بالایی به فسفاتیدیل سرین متصل می شود و از کونژوگه ی این پروتئین با رنگ فلورسانس FITC به طور گسترده در بررسی آپوپتوز به وسیله فلوسیتومتری استفاده می شود (۲۱).
- رنگ آمیزی TUNEL : روش به کار رفته در این تحقیق رنگ آمیزی TUNEL می باشد که تمامی جزئیات کار آن در بخش مواد و روش کار به تفصیل بیان شده است. در این روش انتهای قطعات

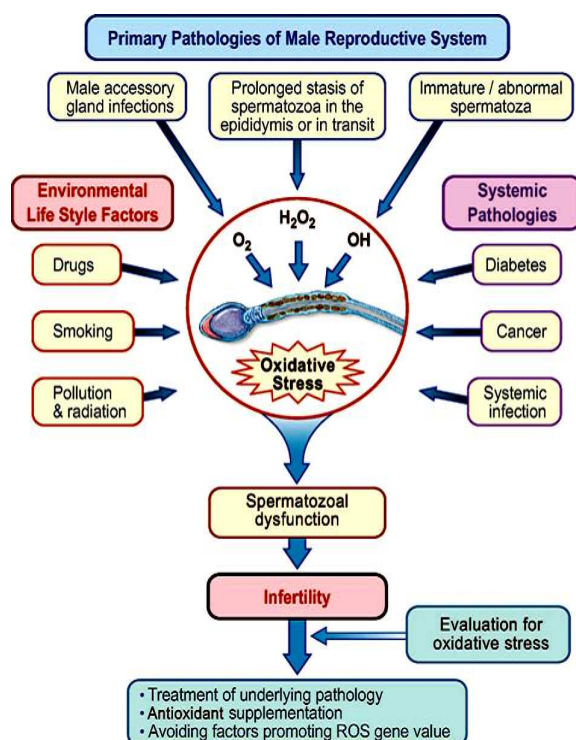
DNA تولید شده به وسیله آنزیم دی اکسی نوکلئوتیدیل ترانسفراز انتهایی (TdT)، با نوکلئوتیدهای جدید تغییر داده شده (فلوئورسین dutp) جایگزین می‌شوند و بنابراین انتهای شکسته شده از قطعات DNA دو زنجیره‌ای، مستقل از زنجیره قالب نشان‌دار شده و سپس در زیر میکروسکوپ فلوئورسنت قابل رویت می‌شود. در این روش حتی سلول‌هایی که در مراحل اول آپوپتوز هستند، نشان‌دار می‌شوند (۲۱، ۲۲).

۱-۲-۶ استفاده از آنتی اکسیدان‌ها در درمان ناباروری مردان

مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که بین شرایط استرس اکسیداتیو در مایع منی و نقص عملکرد اسپرماتوزوآ رابطه وجود دارد. مایع منی طبیعی حاوی آنتی اکسیدان‌های آنزیمی نظیر سوپر اکسید دسموتاز و کاتالاز و آنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی نظیر آسکوربات، α -توکوفرول و پیرووات است که نقش حفاظت از اسپرماتوزوآ را در برابر استرس اکسیداتیو بر عهده دارند (۲۳، ۲۴). در شرایط طبیعی، ROS تولید شده در مایع منی، به طور پیوسته توسط آنتی اکسیدان‌های مایع منی غیرفعال می‌شود.

علی‌رغم وجود این سیستم‌های آنتی اکسیدانی، در بعضی از شرایط تولید ROS افزایش می‌یابد. از جمله این شرایط می‌توان به مواجهه طولانی مدت با نور خورشید، مواجهه با انواع تشعشعات، تماس با مواد سرطان‌زا مثل آزبست، سیگار کشیدن، مصرف طولانی مدت بعضی از داروها، ورزش شدید، مصرف الکل، آلودگی هوا و عوامل عفونی اشاره کرد (شکل ۱-۲) (۱۶).

تحقیقات حاضر پیشنهاد می‌کنند که آنتی اکسیدان‌هایی از قبیل: ویتامین C (آسکوربیک اسید)، ویتامین E، گلوتاتیون، N-acetyl cysteine و *Panax ginseng* (جنسینگ چینی یا کره‌ای) می‌توانند با سرکوب کردن ROS اضافی تولید شده باعث بهبود شرایط استرس اکسیداتیو شوند (۱۵).



شکل ۱-۲: عوامل به وجود آورنده‌ی شرایط استرس اکسیداتیو.

۱-۲-۷- جنسینگ

جنسینگ گیاه دارویی معطر متعلق به جنس *panax* و خانواده آریالیاسه (عشقه) است و در طب سنتی کشورهای آسیایی رایج است (کلمه *panax* از کلمه یونانی به معنی داروی همه دردها گرفته شده است). خاصیت دارویی گیاه جنسینگ مربوط به ریشه آن است. با به کارگیری تکنیک های LC/MS و HPLC.

ترکیبات تشکیل دهنده ریشه جنسینگ شناسائی گشته و مشخص شده است که ریشه این گیاه حاوی ساپونین‌های تری‌ترپنی، روغن‌های ضروری، پلی‌استیلن، پلی‌ساکارید، پتیدوگلیکان، ترکیبات نیتروژنی، اسیدهای چرب، کربوهیدرات‌ها و ترکیبات فنولی می‌باشد (۲۵).



شکل ۱-۳: جنسینگ آسیایی. تصویر سمت راست ریشه جنسینگ را نشان می‌دهد.

مهم‌ترین جزء فعال این گیاه جینسینوزایدها (ساپونین‌ها) هستند که ساختار تری‌ترپنی دارند و فعالیت‌های فارماکولوژیکی گیاه جنسینگ مربوط به این ترکیبات می‌شود (۲۶). فراوان‌ترین انواع جینسینوزایدها Rb^1 ، Rb^2 ، Rc ، Re و Rg^1 هستند که حدوداً ۸۰٪ کل انواع را شامل می‌شوند (۲۷). گیاه جنسینگ به عنوان آداپتوژن محسوب می‌شود. آداپتوژن به معنی فرآورده گیاهی با خواص آنتی‌اکسیدانی است که افزایش مقاومت بدن در برابر عوامل استرس‌زا، تروما، اضطراب، ضعف و خستگی می‌باشد. عصاره این گیاه همچنین بر سیستم عصبی مرکزی اثر داشته و در دستگاه گردش خون موجب اتساع عروق می‌شود. عصاره این گیاه از طریق محور هیپوتالاموس-هیپوفیز - آدرنال عمل می‌کند (۲۵، ۲۸). از خواص دیگر این گیاه می‌توان به موارد ضد سرطانی، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و غیره اشاره کرد (۲۹).

اکثر پژوهش‌های علمی بر روی دو گونه از جنسینگ تمرکز یافته است. *p.ginseng* C.A.Meyer (گونه آسیایی) و *p.quinquefolius* (گونه آمریکایی شمالی). جنسینگ روسی و سیبریایی نباید با جنسینگ اشتباه گرفته شود، زیرا از گیاهی کاملاً متفاوت با آنچه تاکنون ذکر شده، مشتق شده است و خواص آن نیز کاملاً متفاوت است. ریشه‌های جنسینگ آسیایی به دو رنگ سفید و قرمز دیده می‌شوند که این رنگ بستگی به روش خشک کردن آن دارد.

بر اساس دستورالعمل کره‌ای ها، روش‌های متفاوتی برای آماده سازی *panax ginseng* و استفاده از آن وجود دارد. جنسینگ تازه کمتر از ۴ سال سن دارد: نوع سفید آن در ۴ تا ۶ سالگی برداشت شده و پس از پوست کندن (لایه برداری) خشک می‌شود. جنسینگ قرمز (*Korean red ginseng*) در ۶ سالگی برداشت شده، پس از آن بدون لایه برداری، بخارپز و سپس خشک می‌شود. مطالعات، تفاوت‌های اندکی را بین جنسینگ سفید و قرمز نشان می‌دهد اما در مجموع جنسینگ قرمز را از نظر خواص قوی‌تر معرفی می‌کنند. براساس تحقیقات انجام شده، جنسینگ قرمز در درمان *erectile dysfunction* (اختلال در نعوذ) و کاهش فشار خون مؤثر است (۳۰). همچنین این ماده می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی عمل کرده و در بهبود *ototoxicity* و ایسکمی کوکلئار مفید واقع شود. علاوه بر آن جنسینگ قرمز کره‌ای عملکرد آنتی دیابتیک، آنتی ترومبوتیک و ضد انعقادی قوی دارد (۳۱).

۸-۲-۱ - مروری بر آناتومی و بافت‌شناسی دستگاه تولید مثل مذکر

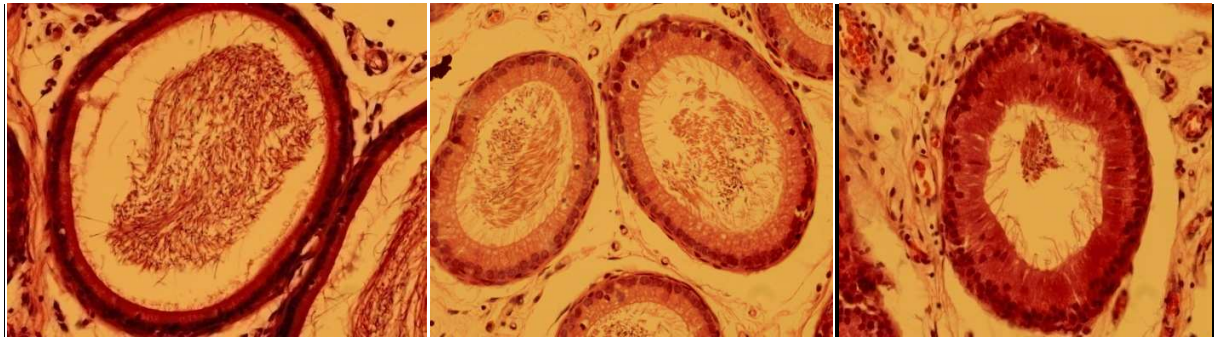
دستگاه تناسلی مرد شامل بیضه‌ها، مجاری ناقل اسپرم، غدد ضمیمه (پروستات، کیسه منی و غده کوپر) و آلت تناسلی مردانه می‌باشد (۳۲).

عمل دوگانه بیضه شامل ترشح هورمون‌ها و تولید اسپرماتوزوآ می‌باشد. هر بیضه دارای ۱۰۰۰ - ۲۵۰ لوله منی‌ساز است. قطر لوله منی‌ساز حدود ۲۵۰ - ۱۵۰ میکرومتر و طول آن در حدود ۷۰ - ۳۰ سانتی‌متر است و کار تولید اسپرماتوزوئیدها با میزان روزانه حدود $10^8 \times 2$ را به عهده دارد (۳۳، ۳۴).

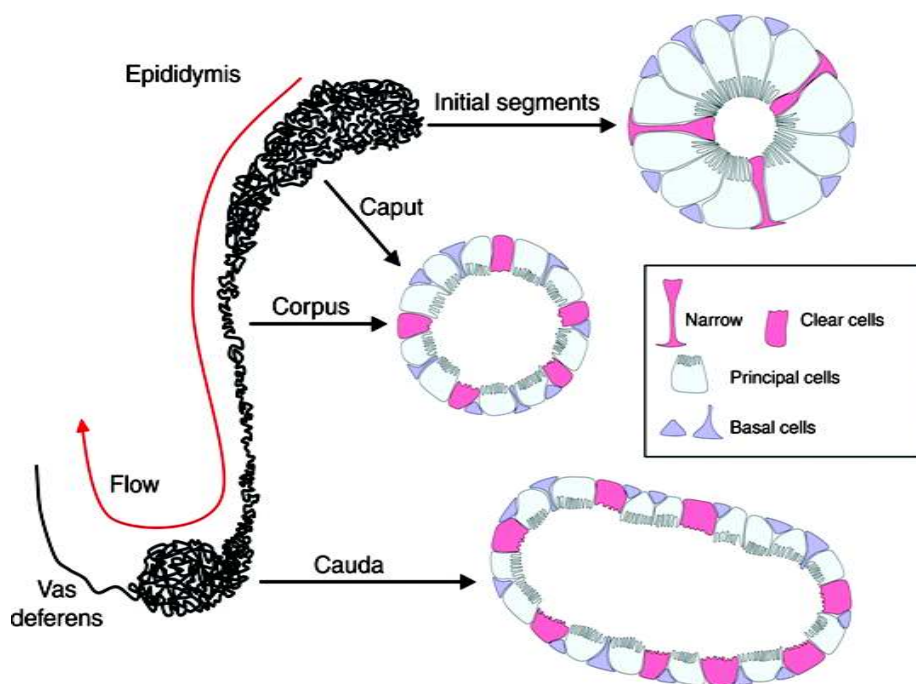
لوله‌های منی‌ساز، از یک اپی‌تلیوم پیچیده مطبق به نام اپی‌تلیوم زایا یا منی‌ساز مفروش شده‌اند. اپی‌تلیوم زایا حاوی دو نوع سلول است: سلول‌های سرتولی و سلول‌هایی که دودمان اسپرماتوژن را تشکیل می‌دهند. مجاری تناسلی ترشحي اسپرماتوزوئیدهای تولید شده در بیضه را به سمت سوراخ خارجی آلت مردانه منتقل می‌کنند. این مجاری عبارتند از: مجرای اپی‌دیدیم، مجرای دفران و پیشابراه.

مجرای اپی‌دیدیم: لوله‌ای منفرد و پیچ‌خورده به طول ۶-۴ متر، دارای بافت پوششی استوانه‌ای مطبق کاذب حاوی مژک‌های ثابت می‌باشد. مجرای اپی‌دیدیم جزء محیط‌هایی محسوب می‌شود که بیشترین تغییر در پروتئین‌های غشاء اسپرم را با ترشح گلیکوفسفوکولین ایجاد می‌کند. به ویژه بخش‌های ابتدای این مجرا، محیط لازم برای بلوغ اسپرماتوزا را فراهم می‌سازد. اسپرماتوزا پس از خروج از بیضه و قبل از انزال بیشترین زمان را در اپی‌دیدیم می‌گذرانند. اسپرماتوزا اکثر تغییرات لازم برای قدرت باروری و تحرک را طی عبور از اپی‌دیدیم کسب می‌کند. مجموعه این تغییرات را بلوغ اسپرماتوزا می‌گویند (۳۳، ۳۴).

اپی‌دیدیم از چهار بخش به نام‌های قطعه اولیه، سر، تنه و دم تشکیل می‌شود (۳۵). ساختار بخش‌های مختلف آن با یک‌دیگر متفاوت است. ارتفاع سلول‌های اپی‌تلیوم و قطر لومن اپی‌دیدیم از قطعه اولیه به سمت دم به ترتیب کاهش و افزایش پیدا می‌کنند. همچنین استریوسیلیاها با نزدیک شدن به سمت دم کوتاه‌تر می‌شوند (شکل ۱-۴ و ۱-۵).



شکل ۱-۴: توبول‌های اپی‌دیدیم (از راست به چپ: قطعه اولیه، سر و دم)



شکل ۱-۵: تصویر بالا نشان دهنده‌ی بخش‌های مختلف اپی‌دیدیم است. همانطور که در تصویر مشاهده می‌کنید ارتفاع اپی‌تلیوم توبول‌ها از قطعه اولیه به سمت دم کاهش پیدا می‌کند.

بر اساس مطالعات انجام گرفته، سر اپی‌دیدیم حساس‌ترین بخش نسبت به فعالیت آندروژن‌هاست (۳۶). در این مطالعه نیز این بخش از اپی‌دیدیم مورد بررسی قرار گرفته است.

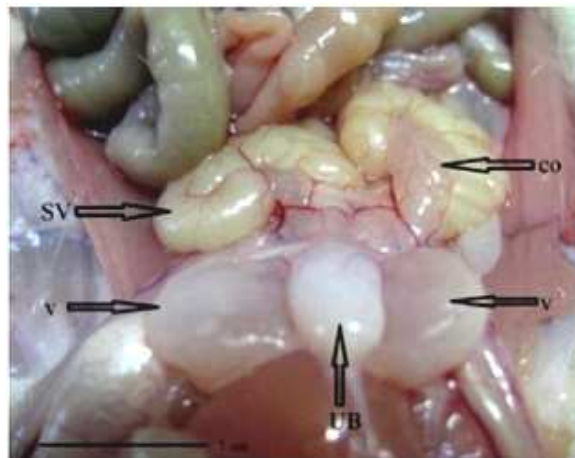
مجرای دفران: لوله ایست منفرد به طول ۴۵ سانتی متر که به وسیله بافت پوششی استوانه‌ای مطابق کاذب حاوی مژک‌های ثابت پوشیده شده است. عضلات صافی که به فراوانی در اطراف مجرا وجود دارد، انقباضات دودی قدرتمندی ایجاد می‌کند که در بیرون ریزی اسپروماتوزوئیدها در حین انزال نقش دارند.

غدد ضمیمه دستگاه تناسلی شامل سمینال‌وزیکل (کیسه منی)، پروستات و غدد بولبو اورتال (کوپر) می‌باشند (۳۳).

کیسه‌های منی: به صورت زوج بین گردن مثانه و پروستات قرار گرفته‌اند. هر کیسه منی لوله‌ای است به طول ۱۵ سانتی متر که چون پیچ خورده به صورت توده کوچکی دیده می‌شود. مخاط آن چین‌خورده و نامنظم بوده و منظره‌ای لانه زنبوری ایجاد می‌کند. اپی‌تلیوم پوشاننده مخاط مطابق کاذب منشوری و متشکل از سلول‌های قاعده‌ای و منشوری است که سلول‌های منشوری دارای میکروویلی‌های کوتاه و حاوی گرانول‌های ترشحی در سیتوپلاسم خود می‌باشند. این سلول‌ها با میکروسکوپ الکترونی خصوصیت سلول‌های پروتئین‌ساز را دارا هستند. فعالیت سلول‌ها بسته به میزان تستوسترون خون می‌باشد و در صورت کاهش هورمون، ارتفاع سلول‌ها کاهش می‌یابد. اپی‌تلیوم به وسیله آستری از جنس بافت همبند غنی از الیاف الاستیک پشتیبانی می‌شود و توسط لایه نازکی از عضلات حلقوی در داخل و طولی در خارج احاطه شده است. عضلات نیز خود توسط بافت همبندی فیبرو الاستیک محصور شده‌اند. کیسه منی مایع غلیظ و زرد رنگی ترشح می‌کند که غنی از فروکتوز و حاوی سیترات، پروستاگلاندین و چندین پروتئین می‌باشد. ترشحات کیسه منی فعال کننده اسپرم‌ها می‌باشند و حدود ۷۰٪ مایع انزالی را تشکیل می‌دهند. رنگ زرد مایع انزالی به علت ترشح پیگمان زرد فلاوین توسط کیسه منی می‌باشد (۳۴).

غده پروستات (prostate gland): غده‌ای است مرکب از ۵۰-۳۰ غده لوله‌ای - حبابی (tubulo alveolar) که پیشابراه پروستاتی را احاطه کرده و ترشحات خود را توسط ۳۰-۱۵ مجرا به آن تخلیه می‌کنند. غدد تشکیل دهنده پروستات براساس موقعیت خود نسبت به پیشابراه به سه دسته تقسیم می‌شوند: غدد مخاطی (mucosal glands) که غدد کوچکی هستند که در مجاورت نزدیک پیشابراه قرار دارند. غدد زیر مخاطی (submucosal gland) بزرگتر از غدد مخاطی‌اند و در اطراف غدد مخاطی قرار دارند. غدد اصلی (main gland) محیطی‌ترین غدد می‌باشند که بزرگترین و بیشترین غدد پروستاتی محسوب می‌شوند. پروستات از بیرون توسط کپسولی از بافت همبند فیبروالاستیک و مملو از عروق و رشته‌های عضله صاف احاطه شده است. تیغه‌هایی از این کپسول جدا شده و با نفوذ به درون پروستات آن را به چندین لوب تقسیم می‌کند (شکل ۶-۱) (۳۳، ۳۴).

غدد پروستاتی توسط سلول‌های مکعبی یا منشوری ساده پوشیده شده‌اند. ترشحات پروستاتی که قسمتی از مایع انزالی (semen) را تشکیل می‌دهند، مایعی سروزی و سفید و حاوی چربی، آنزیم‌های پروتئولیتیک، اسید فسفاتاز، فیبرینولیزین و اسیدسیتریک می‌باشند. ترشحات این غده توسط هورمون دی هیدروتستوسترون کنترل می‌شود. مواد ترشحاتی پروستات در داخل برخی غده‌ها جمع شده و به صورت اجسامی کروی و کوچک و به رنگ اسیدوفیل مشاهده می‌گردند که به شن‌های پروستاتی (prostatic concretions) یا اجسام آمیلاسه (corpora amylacea) معروفند. تعداد این اجسام با پیشرفت سن افزایش می‌یابد و در صورت کلسیفیه شدن آبی مایل به بنفش دیده می‌شوند. هیپرتروفی خوش‌خیم غده که در ۴۰ درصد افراد ۵۰ ساله و ۹۰ درصد افراد ۷۰ ساله دیده می‌شود مربوط به غدد مخاطی است، در صورتیکه سرطان پروستات که در ۳۰ درصد مردان بالای ۷۵ سال مشاهده می‌گردد مربوط به غدد اصلی است (۳۲).



شکل ۱-۶: نمای ماکروسکوپی غده پروستات موش صحرایی. CO لوب قدامی، V لوب شکمی، SV سمینال وزیکل، UB

مثانه

غدد کوپر (Cowper's gland): این غدد که به غدد بولبویورتال (bulbo urethral) نیز موسومند در ابتدای پیشابراه غشائی قرار دارند و ترشحات خود را به آن می‌ریزند. کپسولی از بافت همبند حاوی عضله صاف و مخطط غده را احاطه کرده است. تیغه‌هایی از کپسول جدا و به درون غده نفوذ و آن را به چندین لوب تقسیم می‌کند. این غدد لوله‌ای - حبابی توسط اپی‌تلیوم مکعبی یا منشوری ساده پوشیده شده‌اند و موکوس مترشحه توسط غدد کوپر، غلیظ و لغزنده بوده و نرم کننده مجرای آلتی می‌باشد (۳۳، ۳۴).

الف-هدف اصلی طرح (General Objective):

تعیین تأثیر حمایتی جنسینگ قرمز کره‌ای بر اثرات جانبی سیپروفلوکساسین بر روی ارگان‌های تناسلی (پروستات و اپی‌دیدیم) موش‌های صحرایی بالغ نر عفونی شده با مدل UPEC

ب-اهداف فرعی (Specific Objectives):

۱- تعیین تأثیر جنسینگ بر ساختار بافت‌شناسی اپی‌دیدیم و پروستات در موش‌های عفونی شده با

UPEC

۲- تعیین تأثیر جنسینگ بر ساختار بافت‌شناسی اپی‌دیدیم و پروستات در موش‌های عفونی شده با

UPEC که سیپروفلوکساسین دریافت کردند.

۳- تعیین تأثیر جنسینگ بر ساختار بافت‌شناسی اپی‌دیدیم و پروستات موش‌هایی که سیپروفلوکساسین

دریافت کردند.

۴- تعیین تأثیر جنسینگ بر میزان آپوپتوز سلول‌های اپی‌دیدیم و پروستات موش‌های عفونی شده با

UPEC

۵- تعیین تأثیر جنسینگ بر میزان آپوپتوز سلول‌های اپی‌دیدیم و پروستات موش‌های عفونی شده با

UPEC که سیپروفلوکساسین دریافت کردند.

۶- تعیین تأثیر جنسینگ بر میزان آپوپتوز سلول‌های اپی‌دیدیم و پروستات موش‌هایی که سیپروفلوکساسین

دریافت کردند.

ج-اهداف کاربردی (Applied Objectives):

با استفاده از یافته‌های حاصل از این پژوهش احتمالاً بتوان برای کاهش میزان ناباروری حاصل از عفونت‌های باکتریایی و اثرات جانبی ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکوینولون در مردان، راهکار مناسبی پیشنهاد نمود.

د-فرضیه ها (Hypothesis) یا سؤال‌های پژوهش:

- جنسینگ اثرات حفاظتی بر ساختار بافتی و شدت التهاب در پروستات و اپی‌دیدیم موش‌های عفونی شده‌ای که سیپروفلوکساسین مصرف می‌کنند، دارد.
- جنسینگ اثرات حفاظتی بر میزان آپوپتوز سلول‌های پروستات و اپی‌دیدیم موش‌های صحرایی نر عفونی شده با UPEC که سیپروفلوکساسین مصرف می‌کنند، دارد.

فصل دوم

مروری بر متون

عفونت دستگاه تناسلی مردان یکی از عوامل اثرگذار بر کاهش میزان باروری آنهاست. از طرفی درمان این عفونت‌ها با آنتی‌بیوتیک‌هایی چون سیپروفلوکساسین که امروزه به صورت روتین در مراکز درمانی تجویز می‌شود با اثرات جانبی دیگری بر دستگاه تناسلی مردان همراه است. از این‌رو محققان بسیاری اقدام به انجام مطالعات در این زمینه کرده‌اند.

Elkahwaji و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داده‌اند که عفونت ایجاد شده توسط *E.coli* منجر به ادم بافت بینابینی و انفیلتراسیون سلول‌های التهابی در بافت پروستات و ریخته شدن سلول‌های اپی‌تلیالی پروستات به درون لومن مجرا شده است. همچنین مراکز متعددی از هایپرپلازی در اپی‌تلیوم پروستات موش‌های عفونی گزارش شده که مشخصه آن افزایش ضخامت لایه سلول‌های اپی‌تلیالی و پرزدار شدن این لایه بوده است (۳۷). در مطالعه‌ای که توسط Tremellen در سال ۲۰۰۸ انجام شده نشان داده شده است که باکتری *E.coli* منجر به افزایش تولید ROS شده و این امر می‌تواند بر باروری مردان تأثیر سوء بگذارد (۳۸).

بر اساس مطالعه انجام شده توسط Lang و همکاران در سال ۲۰۱۳، سه روز پس از تزریق *E.Coli* در موش‌ها، اپی‌دیدیم‌ها قرمز شده و این سرخی نشان دهنده‌ی تغییرات هیستوپاتولوژیکی ایجاد شده در آنها بود. بر طبق بررسی‌های میکروسکوپی، فضای بینابینی اپی‌دیدیم‌ها، به دلیل وجود تعداد بالایی از سلول‌های التهابی دچار تورم و آماس شده‌اند. همچنین تغییراتی در اپی‌تلیوم اپی‌دیدیم موش‌های عفونی شده با UPEC مانند کاهش استریوسیلیاها مشاهده شد (۳۹).

بر طبق مطالعات *genotoxicity* در محیط *in vivo* در سال ۲۰۱۲، سیپروفلوکساسین به طور قابل توجهی عملکرد و ساختار بیضه‌ها را تحت تأثیر قرار داده و تخریب می‌کند. همچنین تزریق سیپروفلوکساسین، تعداد اسپرم، تحرک و تولید روزانه اسپرم در رت‌ها را کاهش می‌دهد (۱۲). Demir و همکاران (۲۰۰۷) نشان داده‌اند که در رت‌های سالم، سیپروفلوکساسین تخریب بافتی قابل توجهی همراه با کاهش در حجم بیضه و تعداد اسپرم‌ها به وجود آورده است (۴۰). نتایج یک بررسی انجام شده بر روی ۲۰ رت نر بالغ که سیپروفلوکساسین را با دوز ۱۲.۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از راه دهان دریافت کردند (به مدت ۶۰ روز) نشان داده است که وزن بیضه، اپی‌دیدیم و سمینال وزیکل آن‌ها به طور قابل توجهی کاهش یافت. این مسئله حاکی از آن است که این آنتی‌بیوتیک اثر سمی بر ارگان‌های تناسلی مردان دارد (۱۳).

Abu-Aita و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر سیپروفلوکساسین و دو آنتی‌اکسیدان N-Acetyl cysteine (NAC) و ginger را بر ارگان‌های تناسلی ۴۹ رت بررسی کردند. نتایج حاصله نشان دهنده‌ی کاهش وزن قابل توجه در ارگان‌های تناسلی (بیضه، اپی‌دیدیم و سمینال‌وزیکل‌ها) مربوط به گروه دریافت‌کننده‌ی سیپروفلوکساسین بود. بررسی میکروسکوپی نمونه‌های تهیه شده، نکروز مشخصی را در سلول‌های اسپرماتوگونیال پوشاننده‌ی لوله‌های منی‌ساز نشان داد که این وضعیت در نمونه‌های تهیه شده از رت‌های تحت درمان با دو آنتی‌اکسیدان، بهبود یافته بود. در رابطه با اپی‌دیدیم، مقاطع تهیه شده از نمونه‌ی رت‌های تحت تأثیر با سیپروفلوکساسین نشان دهنده‌ی ادم بافت بینابینی در فضای مابین توبول‌های اپی‌دیدیم و همچنین افزایش تراکم عروق خونی در این فضا بود. در این مطالعه، در اپی‌دیدیم رت‌های تحت تأثیر با سیپروفلوکساسین و ginger هیچ تغییر هیستوپاتولوژیک نشان داده نشد اما در اپی‌دیدیم رت‌های گروه سیپروفلوکساسین و NAC، ادم بافت بینابینی در فضای مابین توبول‌ها همراه با انفیلتراسیون سلول‌های التهابی

مشاهده شد. هیچ تغییر هیستوپاتولوژیکی در مقاطع تهیه شده از رت‌های گروه تحت تأثیر با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و دو آنتی اکسیدان ginger و NAC به وجود نیامد. در مورد سمینالوزیکل‌ها نیز در گروه سیپروفلوکساسین، هایپرپلازی سلول‌های اپی‌تلیالی و انفیلتراسیون سلول‌های التهابی لکوسیت به داخل لایه‌ی عضلانی گزارش شد. بر اساس نتایج نشان داده شده سیپروفلوکساسین اثرات توکسیک در اجزای تناسلی در رت‌ها را از طریق ایجاد آسیب اکسیداتیو به وجود می‌آورد که شامل اثرات مخرب بر وزن ارگان‌های تولیدمثلی، پارامترهای اسپرم (تعداد، تحرک و قابلیت زیستی)، هورمون‌های تولیدمثلی (تستوسترون، LH و FSH) و ساختارهای بافتی می‌باشد (۴۱).

بر طبق نظر schrader در سال ۲۰۰۳ کاهش وزن مشاهده شده در ارگان‌های تناسلی فرعی در گروه‌های تحت درمان با سیپروفلوکساسین ممکن است به علت bioavailability کاهش یافته‌ی هورمون‌های جنسی باشد (۴۲). سیپروفلوکساسین، کاسپاز ۳ را فعال می‌کند و این امر منجر به افزایش آپوپتوز سلول‌های زایا در جنس مذکر می‌شود (۴۳). در مطالعه‌ی بافت‌شناسی انجام شده در سال ۲۰۰۵ بر روی پروستات ۴۱ رت عفونی شده با E.Coli، پس از ۲ هفته درمان با سیپروفلوکساسین، همچنان در جاتی از انفیلتراسیون سلول‌های التهابی، تغییرات آسینی‌ها و فیروز بافت بینابینی باقی ماند (۴۴). همچنین در درمان اپی‌دیدیمیت (epididymitis) با استفاده از آنتی‌بیوتیکی از خانواده فلوروکوینولون‌ها، تشکیل آبسه، تخریب اپی‌تلیوم مجرای اپی‌دیدیم و همچنین افزایش التهاب مزمن در اپی‌دیدیم رت‌ها مشاهده شد (۴۵).

در بررسی انجام شده در سال ۲۰۱۲ نشان داده شده است که سیپروفلوکساسین می‌تواند سنتز کاسپاز ۸ و ۹ را برای شروع فرآیند آپوپتوز افزایش دهد و این خود می‌تواند عامل تهدید کننده‌ای برای باروری مردان باشد (۴۶).

بر طبق تحقیق انجام شده توسط **Khaki** و همکاران در سال ۱۳۸۵، سیپروفلوکساسین با اثرات سیتوتوکسیک بر سلول‌های رده اسپرماتوسیت اولیه، سبب افزایش مرگ سلولی این رده از سلول‌ها گشته و در نتیجه با اثراتی که بر پارامترهای سلامتی اسپرم خواهد گذاشت، سبب کاهش میزان باروری در انسان می‌گردد (۲).

مطالعات گذشته نشان داده‌اند که آنتی اکسیدان‌ها باعث ایجاد حفاظت در مقابل سیپروفلوکساسین می‌گردند که از طریق از بین بردن **ROS** (Reactive Oxygen Species) ایجاد شده طی مصرف این آنتی‌بیوتیک می‌باشد (۴۷). در آزمایشات دیگری نشان داده شده است که تولید **ROS** در حد فیزیولوژیک نقش مهمی در فرایندهای انتقال پیام در اسپرماتوزوآها دارد. **ROS** تولید شده در سلول باید به طور پیوسته غیرفعال شود به طوریکه غلظت آن همیشه در حد بسیار اندکی که برای عملکرد طبیعی سلول لازم است، باقی بماند و عدم تعادل بین تولید و حذف **ROS** منجر به ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو می‌شود (۱۶).

همانطور که قبلاً گفته شد، بر طبق مطالعات **Abu-Aita** و همکاران، در اپی‌دیدیم و سمینال وزیکل رت‌هایی که در گروه سیپروفلوکساسین و دو آنتی‌اکسیدان **ginger** و **NAC** قرار داشتند، هیچ تغییری از لحاظ بافت‌شناسی به وجود نیامد و این نشان دهنده‌ی اثر حفاظتی **ginger** و **NAC** بر اثرات سوء سیپروفلوکساسین است (۴۱).

بر اساس مطالعات انجام شده توسط **Lee** و همکاران در سال ۲۰۰۵ اثرات حفاظتی **catechin** (آنتی‌اکسیدان موجود در چای سبز) بر پروستات موش‌های عفونی شده با **E.Coli** به اثبات رسید. در درمان **CBP** (**Chronic Bacterial Prostatitis**) آنتی‌بیوتیک به عنوان یک استاندارد طلایی در سطح جهانی شناخته شده است. اگرچه همه‌ی موارد **CBP** به درمان آنتی‌بیوتیک به تنهایی، جواب نمی‌دهد. درمان **CBP** مشکل

است و دلیل اصلی آن، این است که تنها، داروهایی با وزن مولکولی پایین و قابل حل در چربی که به طور محکم به پروتئین‌های پلاسما متصل نباشند می‌توانند از غشای اپی‌تلیالی پروستات انتشار پیدا کنند. بنابراین درمان طولانی مدت و با دوز بالای آنتی‌بیوتیک در موارد CBP نیاز است و این نوع درمان خود می‌تواند اثرات سوئی داشته باشد به این دلیل در این مطالعه از آنتی‌اکسیدان catechin و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین به طور هم‌زمان در درمان پروستاتیت استفاده شد و درجاتی از بهبودی در موش‌های درمان شده با catechin گزارش شد (۴۴).

یکی از آنتی‌اکسیدان‌های معروف در سطح جهانی جنسینگ (ginseng) می‌باشد. جنسینگ یکی از هفت محصول پر فروش پزشکی جهان است که عملکردهای گسترده‌ای روی سیستم اعصاب مرکزی دارد به عنوان مثال گزارش شده که باعث بهبودی حافظه و یادگیری می‌شود (۴۵). در شماری از مطالعات که برای درمان ناباروری از گیاهان از جمله جنسینگ استفاده شده است مشاهده شد که این گیاه اثرات جانبی کمی داشته و تجویز آن نتایج خوبی را به دنبال داشت (۴۸).

پاناکس جنسینگ یکی از قدیمی‌ترین و شناخته شده‌ترین گیاهان دارویی است که در جلوگیری از اختلال عملکردهای جنسی به کار می‌رود. طبق بررسی انجام شده در سال ۲۰۱۰ مشخص شده که فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی جنسینگ با افزایش سنتز نیتریک اکسید (NO) در اندوتلیوم ریه، قلب، کلیه و جسم غاری همراه است. افزایش NO باعث وازودیلاسیون (اتساع عروق) شده و این مسئله احتمالاً در تقویت غرایز جنسی دخیل می‌باشد (۴۹).

Ernst در سال ۲۰۱۰ برخی از مکانیسم‌های عملکردی جنسینگ همچون اثرات آنتی‌آپوپتوتیک، ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی را گزارش داده است (۳۰). Jafari و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که هر دو جنسینگ آسیایی و آمریکایی می‌توانند نقش مهمی در درمان سرطان روده بزرگ ایفا کنند مخصوصاً اگر به صورت جوشانده یا بخارپز مصرف شوند. به نظر می‌رسد که برخی مواد بیواکتیو موجود در جنسینگ (جنسینوزاید‌های Rg^3 و Rh^2) بیشترین اثر ضد سرطانی را ایجاد می‌کنند (۵۰). نتایج حاصل از یک بررسی که Choi و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر روی موش‌هایی که دچار CBP شده‌اند انجام داده‌اند نشان می‌دهد که جنسینگ ماده‌ای مؤثر در درمان CBP می‌باشد. در این مطالعه از سیپروفلوکساسین به عنوان دارویی مؤثر در درمان CBP استفاده شده و همچنین برای کاهش اثرات جانبی سیپروفلوکساسین، از جنسینگ و Urovaxom استفاده شده است. بر اساس داده‌های حاصل، درمان ترکیبی جنسینگ با سیپروفلوکساسین و همچنین Urovaxom با سیپروفلوکساسین می‌تواند بسیار مؤثر واقع شود (۵۱). Young-Ho Kim و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش داده‌اند که جنسینگ قرمز کره‌ای می‌تواند با سرکوب فرآیند تولید سوپراکسید، اختلال عملکرد بیضه را بهبود بخشد (۴).

Kim و همکاران در سال ۲۰۱۰ به بررسی اثر آنتی‌آپوپتوتیک جنسینگ پرداختند. بر طبق نتایج آن‌ها استرس اکسیداتیو می‌تواند مرگ سلولی را افزایش داده و منجر به القای بیان ژن‌های pro-inflammatory شود. اما استفاده از جنسینگ قرمز کره‌ای قبل از درمان می‌تواند این فرآیند را معکوس کند و باعث کاهش بیان ژن‌های pro-inflammatory و pro-apoptotic شود (۵۲).

در مطالعه دیگری که Kim و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی اثرات حفاظتی جنسینگ بر CBP انجام داده‌اند، نشان داده شده است که جنسینگ توانسته انفیلتراسیون سلول‌های التهابی به درون بافت پروستات و همچنین

میزان فیروز بینابینی را نسبت به گروه عفونی به طور معنی داری کاهش دهد. این اثر وقتی بیشتر شده است که

به طور همزمان از ترکیب جنسینگ و آنتی بیوتیک برای درمان CBP استفاده شده است (۵۳).

Nguyen و همکاران در سال ۲۰۱۴، با مطالعه‌ای بر روی سلول‌های مغزی (نوروبلاستوما) نشان دادند که

جنسینگ قرمز کره‌ای، استرس اکسیداتیو را سرکوب کرده و در نتیجه آپوپتوز را مهار می‌کند (۵۴).

فصل سوم

مواد و روش‌ها

۳-۱- گروه‌بندی حیوانات

در این مطالعه تعداد ۷۲ سر موش صحرایی نر از نژاد Wistar با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم و محدوده سنی ۲-۳ ماه استفاده شد که از دانشگاه شهید بهشتی تهران خریداری شدند؛ هر ۸ سر موش در یک قفس به مدت یک هفته در حیوان‌خانه در درجه حرارت ۲۲-۲۴ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۰-۵۰ درصد و در ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی به منظور تطابق با شرایط محیطی و پرهیز از استرس‌های اضافی قرار داده شدند. همچنین غذای استاندارد و آب به میزان کافی در اختیار حیوانات قرار گرفت. شرایط فیزیکی و بهداشتی محل نگهداری مطلوب بود. تهویه اتاق بطور مداوم انجام می‌شد. قفس‌ها هر روز تمیز می‌شد. سپس حیوانات به طور تصادفی به ۹ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. گروه‌ها به صورت زیر تحت مطالعه قرار گرفتند. (درمان با سیپروفلوکساسین و جنسینگ ۴۸ ساعت پس از ایجاد عفونت آغاز شده و تا ۱۰ روز ادامه داشت (۴۰)).

گروه ۱: عفونی نشده، سیپروفلوکساسین و جنسینگ هم دریافت نکردند (گروه کنترل).

گروه ۲: موش‌های این گروه نیز عفونی نشده و سیپروفلوکساسین و جنسینگ دریافت نکردند، فقط فرآیند جراحی انجام شد و به جای تزریق باکتری، ۰/۱ ml نرمال‌سالین به داخل واژدفران تزریق شد و موش‌ها فسفات بافر شده‌ی سالین (PBS, PH= ۷.۲) را از طریق گاواژ روزی یک‌بار به مدت ۱۰ روز دریافت کردند (گروه sham) (۵۵, ۵۶).

گروه ۳: عفونی نشده و فقط جنسینگ را با دوز ۱۵ mg/kg روزانه به مدت ۱۰ روز توسط تزریق داخل صفاقی دریافت کردند (۵۷).

گروه ۴: عفونی نشده و فقط سیپروفلوکساسین را از راه دهان توسط لوله‌ی معدی روزی یک‌بار با دوز mg/kg ۱۵۰ تا ۱۰ روز دریافت کردند که استوک آن با حل کردن پودر سیپروفلوکساسین در آب مقطر تهیه شده بود (دوز درمانی از درمان انسانی تقلید شده است) (۴۰).

گروه ۵: عفونی نشده و طی ۱۰ روز سیپروفلوکساسین (mg/kg ۱۵۰) و جنسینگ (mg/kg ۱۵) دریافت کردند.

گروه ۶: موش‌های این گروه با باکتری اشریشیاکالی (سویه‌ی استاندارد m^{39}) عفونی شدند (تزریق ۰.۱ ml $E.coli$ (1×10^8 CFU/mL) به داخل هر واژدفران) (۵۸, ۴۰, ۱۷).

گروه ۷: عفونی شده و روزانه جنسینگ را با دوز mg/kg ۱۵ دریافت کردند.

گروه ۸: عفونی شده و روزانه mg/kg ۱۵۰ سیپروفلوکساسین دریافت کردند.

گروه ۹: عفونی شده و روزانه جنسینگ (mg/kg ۱۵) و سیپروفلوکساسین (mg/kg ۱۵۰) دریافت کردند.

۳-۲- روش عفونی کردن حیوان

در این بررسی سوویه‌ی استاندارد M^{39} اشریشیاکالی مورد استفاده قرار گرفته است. آماده سازی باکتری مورد نظر به روش زیر انجام شد: جهت دفریز نمودن این باکتری ابتدا یک ساعت در دمای $20^{\circ}C$ - سپس به مدت ۳ الی ۴ ساعت در دمای یخچال و بعد از آن به دمای $37^{\circ}C$ منتقل شد. این باکتری مجدداً در محیط TSB کشت داده شد. سپس از محیط TSB به محیط EMB منتقل و پس از یک شب انکوباسیون در دمای $37^{\circ}C$ باکتری‌ها در محیط LB broth تلقیح و ۲ ساعت در انکوباتور با دمای $37^{\circ}C$ در حال shaking ماندند تا

به فاز تکثیر (exponential) برسند، سپس باکتری‌ها به مدت ۸ دقیقه در سانتیفریوژ با دور ۴۵۰۰ سانتیفریوژ شده و بعد با PBS یک‌بار شست‌وشو داده شدند و سپس $OD = 0.06$ با دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد و باکتری با OD مورد نظر با حجم تزریق ۰.۱ ml به هر وازودفران تزریق شد (۱۷، ۴۰، ۵۸).

۳-۳- روش آماده‌سازی جنسینگ

ابتدا سوسپانسیونی از پودر سفید رنگ حاصل از ریشه جنسینگ (ساخت کشور آمریکا) با اتانول ۵۰٪ آماده و سپس سوسپانسیون جوشانده و در Vacuo (دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی زنجان) تغلیظ شد. ماده‌ی حاصله با یک speed vac خشک شده و استخراج‌های خشک شده با استفاده از PBS مجدداً حل شدند (۵۹).

۳-۴- تشریح و نمونه‌برداری

چهارده روز پس از اتمام آخرین تزریق، رت‌ها با تزریق کتامین (۵۰ mg/kg) و زایلازین (۱۲ mg/kg) بیهوش شدند (۴۰، ۴۴). پس از ثابت کردن حیوان، به وسیله قیچی و پنس پوست ناحیه دنده‌ها و قفسه سینه را در امتداد خط میانی بدن تا قاعده گردن برش داده، با استفاده از تیغ بیستوری و قیچی یک شکاف طولی در امتداد خط میانی بدن ایجاد شد، سپس با سرعت و با دقت فراوان پروستات و اپی‌دیدیم جدا شده و به قطعات کوچک تقسیم شدند. سپس در فرمالین ۱۰٪ با PH ۷/۲ به مدت ۷۲ ساعت جهت فیکساسیون قرار داده شدند؛

پس از آن مراحل آب‌گیری تدریجی با اتانول (۱۰۰٪ - ۵۰٪) و شفاف‌سازی با زایلین و قالب‌گیری در پارافین انجام شد و برش‌های سریالی ۵ میکرونی تهیه و در نهایت از هر نمونه ۵ برش انتخاب شده (برش‌های شماره ۵، ۸، ۱۱، ۱۴ و ۱۷) و توسط هماتوکسیلین و ائوزین جهت مشاهدات هیستوپاتولوژی برای میکروسکوپ نوری رنگ‌آمیزی شدند.

۳-۵- تهیه محلول‌های مورد نیاز به منظور بررسی مورفومتری

الف- طرز تهیه فیکساتیو فرمالین ۱۰ درصد

ب- طرز تهیه هماتوکسیلین

۵ گرم هماتوکسیلین را در ۵۰ سی سی الکل مطلق و ۱۰۰ گرم آلوم را در ۱۰۰۰ سی سی آب مقطر حل می‌کنیم (جهت حل نمودن آلوم از حرارت استفاده شد). سپس هماتوکسیلین را به آن اضافه کردیم و مخلوط حاصل را حرارت دادیم. محلول را از حرارت دور کرده و آهسته آهسته اکسید مرکوریک را به آن اضافه کردیم تا به رنگ بنفش تیره در آمد. دوباره حرارت دادیم و سریع از حرارت دور کردیم و صبر کردیم تا سرد شود. پس از سرد شدن به ازای هر ۱۰۰ سی سی از محلول فوق ۴-۲ سی سی اسید استیک اضافه شد. در نهایت محلول آماده شده را صاف کرده و مورد استفاده قرار دادیم.

ج- طرز تهیه ائوزین

۳ گرم پودر ائوزین را در ۵۰ سی سی آب مقطر حل کرده و کاملاً تکان دادیم، سپس ۴ سی سی اسید استیک گلاسیال اضافه شد.

د- طرز تهیه اسید الکل

برای تهیه اسید الکل، ۱ سی سی اسید کلریدریک به ۹۹ سی سی اتانول ۷۰٪ اضافه شد.

ه- طرز تهیه کربنات لیتیم

برای تهیه کربنات لیتیم نیز ۲ گرم پودر کربنات لیتیم را در ۱۰۰ سی سی آب مقطر حل کردیم.

۳-۶- مراحل آماده سازی بافت جهت مطالعه با میکروسکوپ نوری

همان طور که گفته شد؛ پس از کشتن موش ها، نمونه های مورد نظر در فرمالین ۱۰٪ نگهداری شد. نام هر نمونه و شماره حیوان مورد نظر روی ظرف نوشته شد. برای اینکه فیکساسیون بخوبی انجام گیرد، ابعاد نمونه ها تا حد امکان، کوچک انتخاب گردید و حجم فیکساتیو ۱۰۰-۵۰ برابر حجم نمونه انتخاب شد. نمونه ها به مدت ۷۲ ساعت در فیکساتیو باقی ماندند. سپس مراحل پاساژ یا گردش بافت توسط دستگاه Tissue Processor طبق مراحل زیر انجام شد:

الف- فیکساسیون (Fixation)

محلول	مدت	حجم
فرمالین ۱۰ درصد	۳ ساعت	۵۰-۱۰۰ برابر حجم نمونه
فرمالین ۱۰ درصد	۳ ساعت	۵۰-۱۰۰ برابر حجم نمونه

ب- آب گیری (Dehydration)

محلول	مدت	حجم
الکل اتیلیک ۷۰٪	۱ ساعت	۵۰-۱۰۰ برابر حجم نمونه
الکل اتیلیک ۸۰٪	۱ ساعت	۵۰-۱۰۰ برابر حجم نمونه
الکل اتیلیک ۹۰٪	۱/۵ ساعت	۵۰-۱۰۰ برابر حجم نمونه
الکل اتیلیک ۹۶٪	۲:۱۵ ساعت	۵۰-۱۰۰ برابر حجم نمونه
الکل اتیلیک ۹۶٪	۲:۱۵ ساعت	۵۰-۱۰۰ برابر حجم نمونه

ج- شفاف سازی (Clearing)

محلول	مدت	حجم
گزیل ۱	۲ ساعت	۵۰-۱۰۰ برابر حجم نمونه
گزیل ۲	۲ ساعت	۵۰-۱۰۰ برابر حجم نمونه

د- آغشتگی (Impregnation)

محلول	مدت	حجم
پارافین مذاب ۱ (۵۰-۶۰)	۲ ساعت	۲۰-۵۰ برابر حجم نمونه
پارافین مذاب ۲ (۵۰-۶۰)	۲ ساعت	۲۰-۵۰ برابر حجم نمونه

ه- قالب‌گیری (Embedding)

برای تهیه مقاطع میکروسکوپ نوری از نمونه‌های بافت اپی دیدیم و پروستات که مراحل ثبوت و آماده‌سازی را گذرانده‌اند، لازم بود که این نمونه‌ها در بلوک‌های پارافین قالب‌گیری شوند. برای این منظور از قالب‌های کوچک فلزی استفاده شد. برای قالب‌گیری ابتدا پارافین را ذوب کرده و آن را درون قالب تهیه شده ریختیم. سپس نمونه بافت را به وسیله پنس گرم برداشته در پارافین گذاشته و در جهت مناسب قرار دادیم (Orientation). لازم است که به منظور شناسایی نمونه‌های بافتی قالب‌گیری شده، بر روی هر یک از بلوک‌های پارافینی تهیه شده، نام مربوط به هر نمونه نصب شود. بدین ترتیب نمونه در یک بلوک پارافینی در بر گرفته شده و آماده برش می‌باشد.

و- برش یا مقطع‌گیری (Sectioning)

برای تهیه مقاطع میکروسکوپی بافت، از میکروتوم دوار (Shandon-UK) استفاده شد و مقاطعی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه گردید. مقاطع تهیه شده را در ظرف حاوی آب و الکل شناور کردیم. سپس با یک لام این مقاطع را برداشته و به ظرف حاوی آب ۵۰ درجه سانتی‌گراد به گونه‌ای وارد کردیم که مقاطع روی سطح آب شناور گردند و چین و چروک‌ها به خوبی باز شوند. سپس با یک لام دیگر که با قلم الماسه شماره‌گذاری شده، نمونه تهیه شده را از روی آب برداشتیم. اسلایدها را برای مدتی حدود ۶۰-۳۰ دقیقه در آون (Oven) با دمای ۵۸-۵۶ قرار دادیم. این کار باعث می‌شود تا پارافین مقطع بافتی ذوب شده و علاوه بر آن بافت به خوبی بر روی لام بچسبد و در حین رنگ‌آمیزی جدا نشود.

ز- رنگ آمیزی (Staining)

رنگ آمیزی نمونه ها بر اساس روش هماتوکسیلین- ائوزین به شرح زیر انجام گردید :

۱- مراحل رنگ آمیزی H&E

ردیف	ماده	مدت	ردیف	ماده	مدت
۱	گزیل ۱-۱	۵ دقیقه	۱۳	آب جاری	۲ دقیقه
۲	گزیل ۱-۲	۵ دقیقه	۱۴	کربنات لیتیم	۱-۲ بار
۳	گزیل و الکل	۵ دقیقه	۱۵	آب جاری	۲ دقیقه
۴	الکل مطلق ۱-۱	۳ دقیقه	۱۶	ائوزین	۳ دقیقه
۵	الکل مطلق ۱-۲	۳ دقیقه	۱۷	الکل ۷۰٪	۳ دقیقه
۶	الکل ۹۶٪	۳ دقیقه	۱۸	الکل ۹۶٪	۳ دقیقه
۷	الکل ۹۶٪	۳ دقیقه	۱۹	الکل ۹۶٪	۳ دقیقه
۸	الکل ۷۰٪	۳ دقیقه	۲۰	الکل مطلق ۱-۲	۳ دقیقه
۹	الکل ۷۰٪	۳ دقیقه	۲۱	الکل مطلق ۲-۲	۳ دقیقه
۱۰	رنگ هماتوکسیلین	۷-۵ دقیقه	۲۲	گزیل ۱-۲	۵ دقیقه
۱۱	آب جاری	۲ دقیقه	۲۳	گزیل ۲-۲	۵ دقیقه
۱۲	اسید الکل	۱-۲ بار			

۲- چسباندن لامل

پس از خارج کردن لام از گزیلل، ۱ یا ۲ قطره چسب Entellan روی برش ریخته و بعد به آرامی و با دقت لامل را روی برش گذشته و با فشار مختصر چسب را پخش کردیم تا به طور یکنواخت زیر لامل قرارگیرد. باید هرگونه حباب هوا را از زیر آن خارج کرد. لامل‌ها تمیز شد. پس از خشک شدن چسب، لام برای مطالعه با میکروسکوپ نوری آماده شد. تصاویر نهایی از میان ۷۲۰ اسلاید بافتی (مجموع برش‌های به دست آمده از نمونه‌های پروستات و اپی‌دیدیم) تهیه شده، انتخاب شدند. برای عکس گرفتن از میکروسکوپ نوری مدل Ziess و دوربین Canon PowerShot SX ۲۰۰ IS استفاده گردید. جهت تعیین میزان انفیلتراسیون سلول‌های التهابی در بافت بینابینی پروستات و اپی‌دیدیم از بزرگنمایی $100\times$ ، جهت اندازه‌گیری قطر توبول و ارتفاع اپی‌تلیوم و بررسی استریوسیلیاهای اپی‌دیدیم از بزرگنمایی $40\times$ و جهت اندازه‌گیری میزان چروکیدگی آسینی‌ها و فیبروز بافت بینابینی پروستات و ادم بافت بینابینی اپی‌دیدیم، از بزرگنمایی $3.2\times$ استفاده شد.

۳-۷- بررسی مورفومتریک

جهت تعیین میزان انفیلتراسیون سلول‌های التهابی در بافت بینابینی، میزان چروکیدگی آسینی‌ها و فیبروز بافت بینابینی پروستات همچنین جهت تعیین شدت التهاب در اپی‌دیدیم، اندازه‌گیری در سه میدان دید تصادفی از هر برش انجام شد. برای رتبه‌بندی این معیارها از جدول شماره (۳-۱) استفاده شد ($44, 45, 53$). اعداد و درصدهای نشان داده شده در این جدول، بیانگر شدت آسیب‌های بافتی است (عدد صفر کمترین و عدد ۵ بیشترین میزان تخریب را نشان می‌دهند). در اندازه‌گیری چروکیدگی آسینی‌ها در هر میدان دید، نسبت آسینی‌های چروکیده به کل آسینی‌ها، در ارزیابی فیبروز بافت بینابینی پروستات، مساحت بخش‌های فیبروزه

شده با استفاده از نرم افزار Image J (۱.۴۳ u) محاسبه و در نهایت گریدبندی انجام شد. جهت ارزیابی ادم بافت بینابینی در اپی دیدیم، فاصله بین توپول‌ها در مرکز هر میدان دید اندازه‌گیری و سپس بر اساس جدول ۱ رتبه‌بندی شدند. برای تعیین قطر لومن توپول‌های اپی دیدیم، با اندازه‌گیری قطر (فاصله‌ی بین رأس یک سلول تا رأس سلول متناظر در یک مقطع عرضی) بزرگ (D^۱) و کوچک (D^۲) و استفاده از فرمول $d = \sqrt{D_1 * D_2}$ شاخصی برای قطر به دست آمد (۶۰). برای تعیین ارتفاع اپی‌تلیوم اپی دیدیم، فاصله‌ی بین رأس یک سلول (بدون در نظر گرفتن استریوسیلیاها) تا قاعده‌ی همان سلول با استفاده از نرم افزار Image J (۱.۴۳ u) اندازه‌گیری شد. سپس با اندازه‌گیری حداقل ۵ مورد در هر نمونه و تعیین میانگین، پارامترهای فوق مورد آنالیز آماری قرار گرفتند.

جدول شماره ۳-۱: اندازه‌گیری شدت التهاب در بافت پروستات

Score	Inflammatory cell infiltration	Acinar change	Interstitial fibrosis
۰	No evidence	No evidence	No evidence
۱	<۱۰%	<۱۰%	<۱۰%
۲	۱۰-۲۵%	۱۰-۲۵%	۱۰-۲۵%
۳	۲۵-۵۰%	۲۵-۵۰%	۲۵-۵۰%
۴	۵۰-۷۵%	۵۰-۷۵%	۵۰-۷۵%
۵	۷۵-۱۰۰%	۷۵-۱۰۰%	۷۵-۱۰۰%

۳-۸- رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی:

ابتدا برش‌های ۵ میکرومتری از بلوک‌های پارافینی تهیه و سپس بر روی آن‌ها رنگ‌آمیزی تانل انجام شد. مراحل رنگ‌آمیزی طبق دستور شرکت سازنده کیت (Germany-Roche) به صورت زیر انجام گرفت:

(۱) دپارافینه کردن برش‌های بافتی:

الف) انکوباسیون لام‌ها در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه

ب) استفاده از گزیل (شفاف سازی) و درجات مختلف اتانول (آب دهی) مطابق با جدول پایین

مرحله	ماده	غلظت	زمان (دقیقه)
۱	گزیل	%۱۰۰	۱۵
۲	گزیل	%۱۰۰	۱۵
۳	اتانول	%۱۰۰	۲
۴	اتانول	%۱۰۰	۲
۵	اتانول	%۹۶	۲
۶	اتانول	%۹۶	۲
۷	اتانول	%۸۰	۲
۸	اتانول	%۷۰	۲
۹	اتانول	%۳۰	۲

۲) شست و شو با آب دو بار تقطیر، دو بار و هر بار به مدت ۲ دقیقه

۳) انکوباسیون اسلایدها در پروتئیناز K در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه

۴) شست و شو با PBS، سه بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه

۵) انکوباسیون اسلایدها با پراکسید هیدروژن در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی

۶) شست و شو با PBS، سه بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه

۷) انکوباسیون اسلایدها با محلول واکنش گر تانل به میزان ۵۰ میکرولیتر به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه

سانتی گراد

(۸) شست و شو با PBS، سه بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه

(۹) انکوباسیون اسلایدها با محلول کانورتر (POD) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد

(۱۰) شست و شو با PBS، سه بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه

(۱۱) انکوباسیون اسلایدها با محلول دی آمینوبنزدین تتراکلراید (DAB) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی

(۱۲) شست و شو با آب دو بار تقطیر، یک بار به مدت ۲ دقیقه تا واکنش رنگ متوقف شود.

(۱۳) انکوباسیون اسلایدها با همتوکسیلین (رنگ زمینه) به مدت ۳۰ ثانیه در دمای اتاق

(۱۴) شست و شو با آب جاری، یک بار به مدت ۵ دقیقه

(۱۵) استفاده از درجات مختلف اتانول (آب گیری) و زایلن (شفاف سازی) مطابق با جدول پایین

مرحله	محلول	غلظت	زمان (ثانیه)
۱	اتانول	٪۷۰	۴۰
۲	اتانول	٪۸۰	۴۰
۳	اتانول	٪۹۶	۴۰
۴	اتانول	٪۱۰۰	۴۰
۵	اتانول	٪۱۰۰	۴۰
۶	گزلیل	٪۱۰۰	۱۲۰
۷	گزلیل	٪۱۰۰	۱۲۰

۱۶) استفاده از چسب انتلان جهت چسباندن لامل بر روی نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده

۱۷) بررسی اسلایدها با میکروسکوپ نوری

در ادامه سلول‌های آپتوتیک که به رنگ قهوه‌ای مشاهده می‌شدند، در اپی‌تلیوم اپی‌دیدیم و پروستات مورد مطالعه قرار گرفتند.

۳-۹- آنالیز آماری:

یافته‌ها در قالب جداول آماری و شاخص‌های عددی ارائه گردید. برای آنالیز داده‌ها از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه با آزمون تبعی توکی استفاده شد و سطح معنی‌داری ۵ درصد در نظر گرفته شد. همچنین از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ استفاده شد.

فصل چهارم

نتایج و یافته‌ها

۴-۱- نتایج مربوط به مورفولوژی توپول‌های اپی دیدیم (ارتفاع سلول‌های اپی‌تلیال، قطر توپول‌ها و

بررسی استریوسیلیاها)

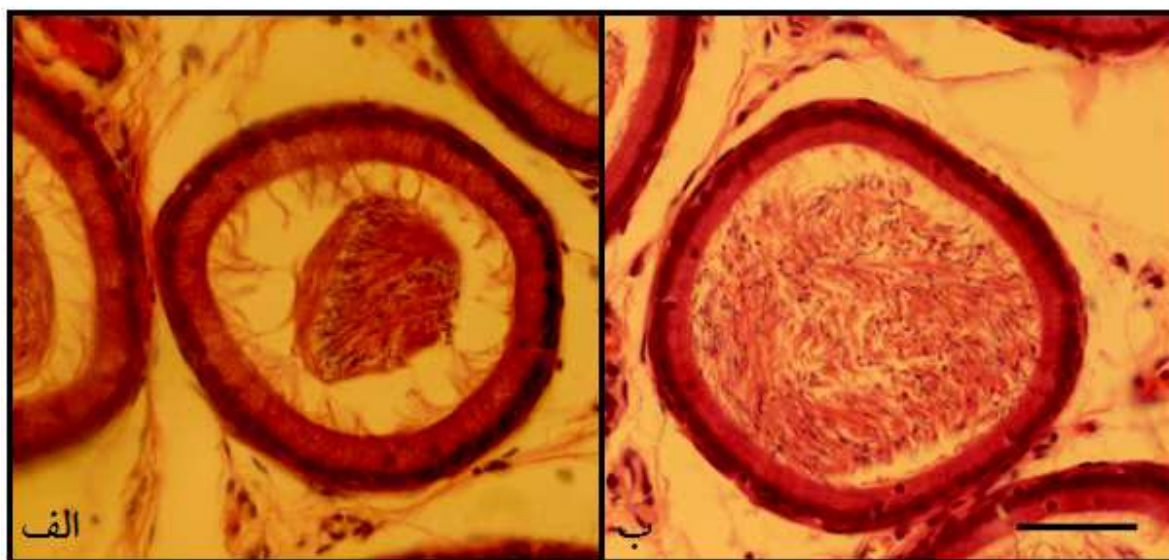
بر اساس نتایج به دست آمده عفونت *E.coli* باعث کاهش قابل توجهی در ارتفاع سلول‌های اپی‌تلیالی اپی دیدیم نسبت به سایر گروه‌ها شده است (جدول ۴-۱). همچنین رت‌های گروه عفونی + سیپروفلوکساسین هم کاهش معنی‌داری در ارتفاع سلول‌ها و قطر توپول نسبت به گروه کنترل پیدا کرده‌اند ($p < 0.05$). سیپروفلوکساسین، کاهش معنی‌داری را در ارتفاع سلول‌های اپی‌تلیوم و قطر توپول‌ها نسبت به گروه کنترل به وجود آورده است اما هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های سیپروفلوکساسین + جنسینگ و کنترل از نظر قطر توپول مشاهده نشد. استفاده از آنتی‌اکسیدان جنسینگ در گروه‌های عفونی باعث افزایش معنی‌داری در ارتفاع سلول‌ها نسبت به گروه عفونی شده است اما تغییر معنی‌داری در افزایش قطر توپول ایجاد نکرده است. در مقایسه بین گروه‌های سیپروفلوکساسین + جنسینگ و سیپروفلوکساسین از لحاظ ارتفاع اپی‌تلیوم و قطر توپول‌ها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. تغییرات قطر توپول و ارتفاع اپی‌تلیوم در گروه عفونی + سیپروفلوکساسین + جنسینگ با گروه عفونی + سیپروفلوکساسین معنی‌دار نبوده اما نسبت به گروه عفونی معنی‌دار بوده است (شکل ۴-۲). بین گروه‌های کنترل، شم و جنسینگ هم از نظر قطر توپول‌ها و ارتفاع اپی‌تلیوم اپی دیدیم تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. بررسی‌های میکروسکوپی از قسمت رأسی سلول‌های اپی‌تلیالی مجاری اپی دیدیم در گروه‌های مورد مطالعه نشان داد که تعداد استریوسیلیاها و طول آن‌ها در گروه‌های عفونی و عفونی + جنسینگ نسبت به گروه کنترل کاهش چشم‌گیری داشته است تا حدی که بخش‌هایی از توپول‌های اپی دیدیم کاملاً فاقد استریوسیلیا بودند اما گروه‌های تحت درمان با سیپروفلوکساسین تغییر قابل توجهی را نسبت به گروه کنترل نشان ندادند (شکل ۴-۱).

جدول شماره ۴-۱: میانگین ارتفاع اپی تلیوم و قطر توبول اپی دیدیم در گروه‌های مورد مطالعه

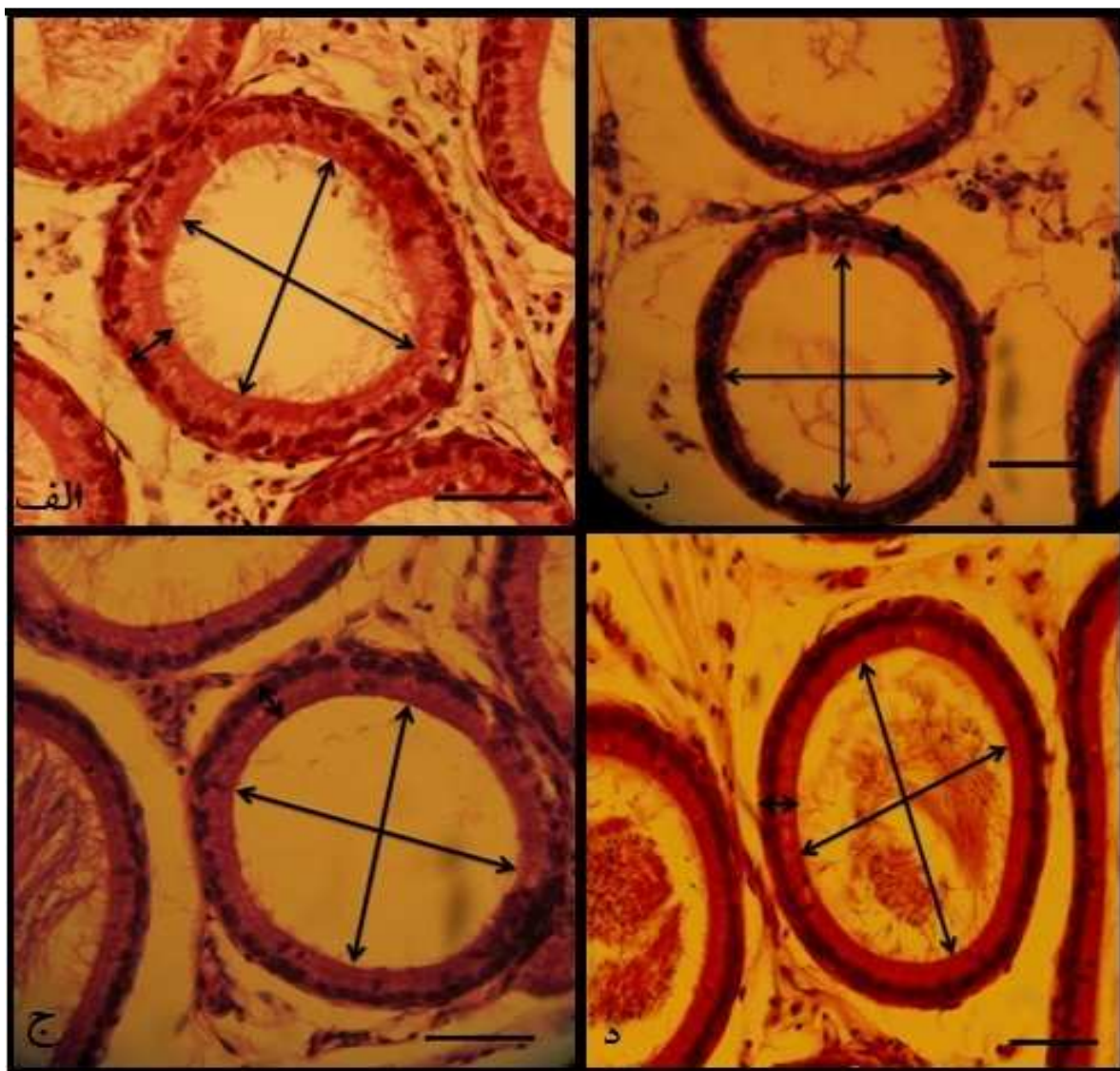
گروه	ارتفاع اپی تلیوم اپی دیدیم (میکرومتر)	قطر توبول اپی دیدیم (میکرومتر)
کنترل	21.26 ± 0.32^a	141.04 ± 2.72^a
شم	20.36 ± 0.42^{ab}	130.00 ± 2.51^{ab}
جنسینگ	20.17 ± 0.26^{abc}	130.61 ± 2.51^{ab}
سیپروفلوکساسین	18.94 ± 0.24^{cd}	126.11 ± 2.31^b
عفونی	15.60 ± 0.18^e	113.80 ± 2.79^c
عفونی+سیپروفلوکساسین	19.48 ± 0.25^{bcd}	127.66 ± 2.58^b
عفونی+جنسینگ	18.62 ± 0.32^d	124.82 ± 2.65^{bc}
سیپروفلوکساسین+جنسینگ	18.98 ± 0.33^{cd}	131.04 ± 2.26^{ab}
عفونی+سیپروفلوکساسین+جنسینگ	18.27 ± 0.23^d	128.44 ± 2.47^b

مقادیر جدول به صورت Mean \pm SEM می باشد.

متغیرهای با حروف ^a و ^b و ^c و ^d و ^e متفاوت در یک ستون به طور معنی داری با هم متفاوت هستند ($p < 0.05$).



شکل ۴-۱: تصاویر میکروسکوپی از اپی دیدیم موش صحرایی. به تعداد و طول استریوسیلیاها در گروه کنترل (الف) توجه کنید. عفونت E.coli باعث تخریب شدید استریوسیلیاها (ب) شده است. (رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی: $\times 400$ ، scale bar = $50 \mu m$)



شکل ۴-۲: قطر و ارتفاع اپی تلیوم توپول‌های اپی دیدیم موش صحرایی. الف: کنترل ب: عفونی ج: عفونی+سیپروفلوکساسین د: عفونی+سیپروفلوکساسین+جنسینگ. فلش‌های رسم شده در درون توپول‌های اپی دیدیم بیانگر قطر بزرگ و قطر کوچک است. همچنین فلش کوچک رسم شده در اپی تلیوم، ارتفاع سلول‌ها را در هر گروه نشان می‌دهد. به کاهش معنی‌دار ارتفاع اپی تلیوم گروه عفونی توجه کنید. تجویز هم‌زمان سیپروفلوکساسین و جنسینگ به موش‌های عفونی باعث افزایش معنی‌دار ارتفاع اپی تلیوم نسبت به گروه عفونی شده است. (رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۴۰۰x، scale bar ۵۰μm)

۲-۴- نتایج مربوط به بررسی شدت التهاب در اپی دیدیم (ادم بافت بینابینی و انفیلتراسیون سلول‌های

التهابی به فضای مابین توبول‌های اپی دیدیم)

بر اساس مطالعات پیشین می‌توان میزان شدت التهاب در اپی دیدیم را بین عدد صفر تا ۵ رتبه بندی کرد. عدد صفر، کمترین شدت و ۵ بیشترین میزان شدت التهاب در اپی دیدیم را نشان می‌دهند. نتایج موجود در جدول شماره (۲-۴) بر اساس این رتبه‌بندی محاسبه شده‌اند. انفیلتراسیون سلول‌های التهابی (مونوسیت، لنفوسیت و نوتروفیل) به فضای مابین توبول‌های اپی دیدیم و همچنین ادم ایجاد شده در بافت بینابینی توبول‌ها، دو شاخص مهم در ارزیابی شدت التهاب می‌باشند.

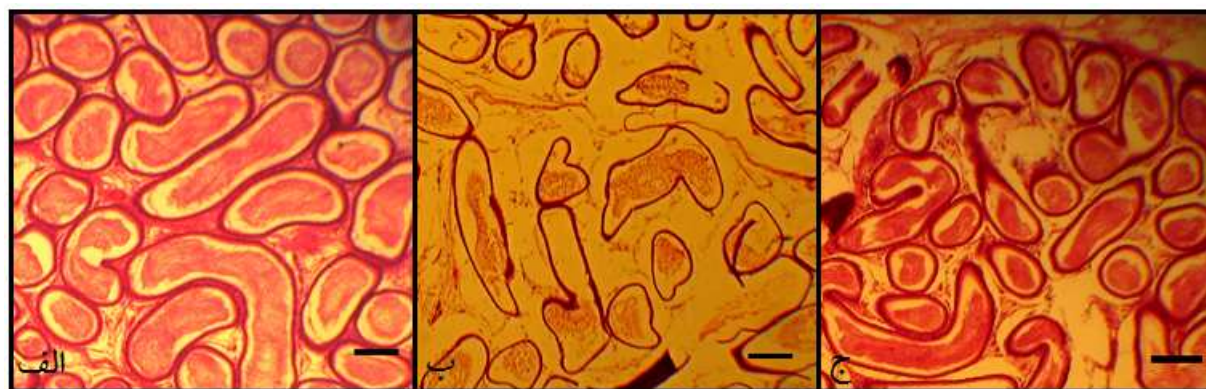
گروه دریافت کننده سیپروفلوکساسین تفاوت معنی‌داری از لحاظ انفیلتراسیون سلول‌های التهابی و ادم بافت بینابینی با گروه کنترل نداشت. همچنین بین گروه سیپروفلوکساسین و عفونی تفاوت معنی‌داری در انفیلتراسیون سلول‌های التهابی مشاهده نشد. اما شدت التهاب در گروه عفونی به طور قابل توجهی نسبت به کنترل افزایش یافت ($p < 0.05$). گروه عفونی دریافت کننده سیپروفلوکساسین کاهش معنی‌داری در میزان ادم و انفیلتراسیون سلول‌های التهابی نسبت به گروه عفونی نشان نداد. اما ترکیب سیپروفلوکساسین و جنسینگ در درمان رت‌های عفونی به طور چشم‌گیری شدت التهاب را نسبت به گروه عفونی کاهش داده است ($p < 0.05$) (شکل ۴-۳). بین گروه‌های کنترل، شم و جنسینگ از نظر میزان ادم و انفیلتراسیون سلول‌های التهابی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. همچنین میزان شدت التهاب در گروه عفونی+جنسینگ نسبت به گروه عفونی کاهش قابل توجهی داشت اما در گروه سیپروفلوکساسین+جنسینگ نسبت به گروه سیپروفلوکساسین تغییر معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول شماره ۴-۲: میزان ادم بافت بینابینی و انفیلتراسیون سلولهای التهابی به فضای مابین توبولهای اپی دیدیم در گروه‌های مورد مطالعه (معیارها، بر اساس درجه شدت التهاب بین ۰ تا ۵ محاسبه شده‌اند).

گروه	انفیلتراسیون سلولهای التهابی	ادم بافت بینابینی
کنترل	1.34 ± 0.1^{ab}	0.23 ± 0.01^a
شم	1.22 ± 0.08^a	0.25 ± 0.01^{ab}
جنسینگ	1.41 ± 0.09^{ab}	0.20 ± 0.01^a
سیپروفلوکساسین	1.95 ± 0.17^{bcd}	0.28 ± 0.01^{ab}
عفونی	2.06 ± 0.13^d	0.41 ± 0.02^d
عفونی + سیپروفلوکساسین	2.04 ± 0.23^{cd}	0.38 ± 0.01^{cd}
عفونی + جنسینگ	1.80 ± 0.13^{abc}	0.27 ± 0.01^{ab}
سیپروفلوکساسین + جنسینگ	1.54 ± 0.09^{abc}	0.21 ± 0.01^a
عفونی + سیپروفلوکساسین + جنسینگ	1.56 ± 0.13^{abc}	0.31 ± 0.02^{bc}

مقادیر جدول به صورت Mean \pm SEM می باشد.

متغیرهای با حروف ^a و ^b و ^c و ^d متفاوت در یک ستون به طور معنی داری با هم متفاوت هستند ($p < 0.05$).



شکل ۴-۳: تصاویر نشان‌دهنده فاصله بین توبول‌های اپی دیدیم موش صحرایی در گروه‌های مختلف است. الف: کنترل ب: عفونی ج: عفونی + سیپروفلوکساسین + جنسینگ. به افزایش قابل توجه فضای مابین توبول‌های اپی دیدیم در گروه عفونی نسبت به کنترل توجه کنید. با تجویز هم‌زمان سیپروفلوکساسین و جنسینگ فواصل بین توبول‌ها به طور چشم‌گیری کاهش یافت. (رنگ‌آمیزی H&E، بزرگمایی $\times 32$ ، scale bar $200 \mu m$)

۳-۴- نتایج مربوط به بررسی شدت التهاب در پروستات (چروکیدگی آسینی‌ها و انفیلتراسیون

سلول‌های التهابی به فضای مابین آسینی‌ها)

همان‌طور که در بخش نتایج مربوط به میزان شدت التهاب در اپی دیدیم گفته شد، بر اساس تحقیقات انجام شده در زمینه پروستاتیت، شدت التهاب در پروستات نیز بین عدد صفر (کمترین میزان) و عدد ۵ (بیشترین شدت) رتبه‌بندی شده است. اندازه‌گیری میزان التهاب ایجاد شده در پروستات به تغییرات آسینی‌ها، انفیلتراسیون سلول‌های التهابی به فضای بینابینی و همچنین شدت فیروز بافت بینابینی بستگی دارد. اعداد نشان داده شده در جدول شماره (۳-۴) بر اساس این رتبه‌بندی به دست آمده‌اند.

بر اساس نتایج به دست آمده، هیچ تغییر قابل توجهی در میزان شدت التهاب بین گروه‌های سیپروفلوکساسین و کنترل به وجود نیامده است. اما عفونت *E.coli* باعث افزایش چشم‌گیر شدت التهاب نسبت به گروه کنترل شده است ($p < 0.05$) (شکل ۴-۴). همچنین تفاوت معنی‌داری بین رت‌های عفونی دریافت کننده سیپروفلوکساسین و رت‌های عفونی مشاهده نشده است در صورتی‌که انفیلتراسیون سلول‌های التهابی در گروه عفونی+سیپروفلوکساسین+جنسینگ کاهش معنی‌داری نسبت به گروه عفونی داشته است. اما کاهش چروکیدگی آسینی‌ها در گروه عفونی دریافت کننده آنتی‌بیوتیک و آنتی‌اکسیدان نسبت به گروه عفونی معنی‌دار نبوده است. همچنین گروه عفونی+جنسینگ، تفاوت معنی‌داری در میزان شدت التهاب نسبت به گروه عفونی نداشته است. بررسی فیروز بافت بینابینی در گروه‌های مورد مطالعه نشان دهنده‌ی افزایش قابل توجه فیروز در گروه‌های عفونی و عفونی+جنسینگ نسبت به سایر گروه‌ها بود.

جدول شماره ۴-۳: شدت تغییرات آسینی ها و انفیلتراسیون سلولهای التهابی به فضای مابین آسینی های پروستات در گروه های مورد مطالعه (معیارها، بر اساس درجه شدت التهاب بین ۰ تا ۵ محاسبه شده اند).

گروه	انفیلتراسیون سلولهای التهابی	تغییرات آسینی ها (میزان چروکیدگی)
کنترل	1.05 ± 0.13^a	2.04 ± 0.38^a
شم	1.10 ± 0.12^a	2.19 ± 0.28^a
جنسینگ	1.24 ± 0.10^a	1.75 ± 0.32^a
سیپروفلوکساسین	1.23 ± 0.12^a	2.27 ± 0.18^a
عفونی	2.18 ± 0.23^b	3.95 ± 0.34^{bc}
عفونی + سیپروفلوکساسین	1.68 ± 0.20^{ab}	3.21 ± 0.46^{abc}
عفونی + جنسینگ	2.15 ± 0.28^b	4.22 ± 0.28^c
سیپروفلوکساسین + جنسینگ	1.51 ± 0.21^{ab}	1.69 ± 0.19^a
عفونی + سیپروفلوکساسین + جنسینگ	1.04 ± 0.06^a	2.60 ± 0.48^{ab}

مقادیر جدول به صورت Mean \pm SEM می باشد.

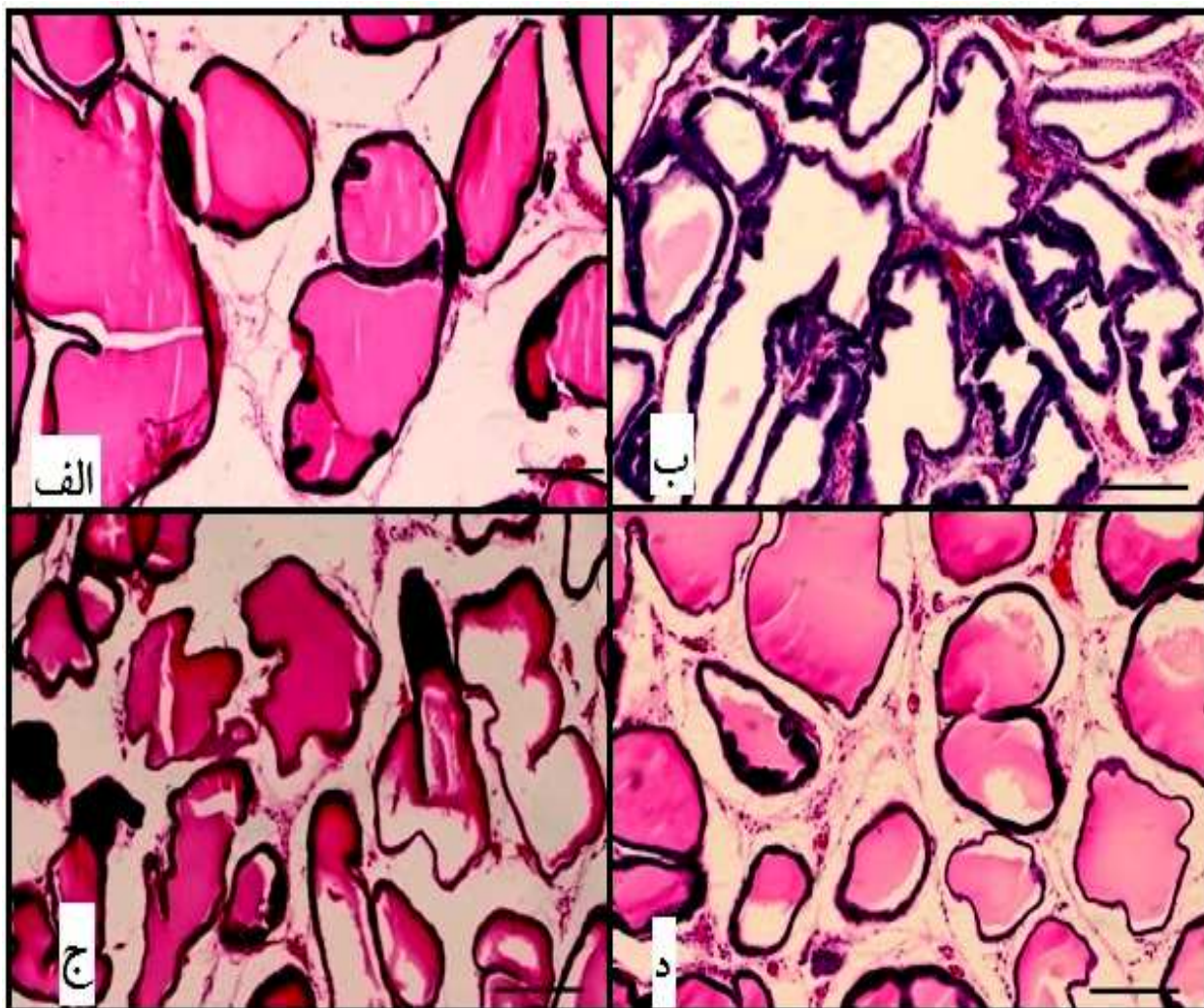
متغیرهای با حروف ^a و ^b و ^c متفاوت در یک ستون به طور معنی داری با هم متفاوت هستند. ($p < 0.05$)

جدول شماره ۴-۴: میزان آپوپتوز سلولهای اپی تلیال اپی تلیوم اپی دیدیم و پروستات در گروه های مورد مطالعه

گروه	میزان آپوپتوز اپی تلیوم اپی دیدیم	میزان آپوپتوز اپی تلیوم پروستات
کنترل	1.1 ± 0.1^a	2.3 ± 0.3^a
شم	1.9 ± 0.2^a	3.1 ± 0.3^{ab}
جنسینگ	2.0 ± 0.2^a	3.0 ± 0.5^{ab}
سیپروفلوکساسین	4.2 ± 0.5^{bc}	7.4 ± 1.0^c
عفونی	4.4 ± 0.7^c	6.2 ± 0.9^c
عفونی + سیپروفلوکساسین	5.3 ± 0.3^c	5.6 ± 0.4^{bc}
عفونی + جنسینگ	2.5 ± 0.2^a	3.4 ± 0.4^{ab}
سیپروفلوکساسین + جنسینگ	2.2 ± 0.2^a	2.7 ± 0.3^a
عفونی + سیپروفلوکساسین + جنسینگ	2.7 ± 0.3^{ab}	2.9 ± 0.4^{ab}

مقادیر جدول به صورت Mean \pm SEM می باشد.

متغیرهای با حروف ^a و ^b و ^c متفاوت در یک ستون به طور معنی داری با هم متفاوت هستند. ($p < 0.05$)

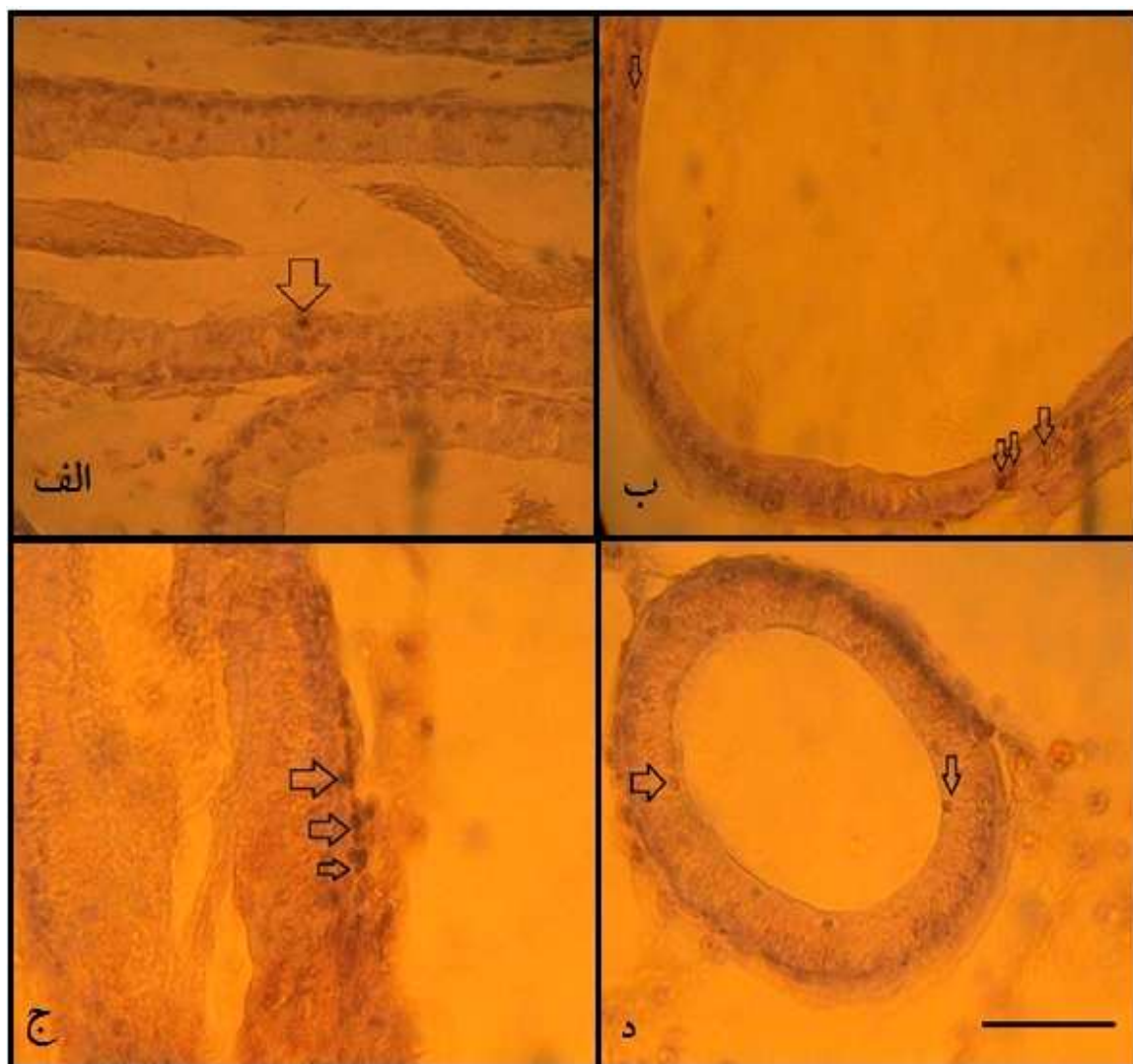


شکل ۴-۴: تصاویر بالا شدت‌های مختلف التهاب را در پروستات موش صحرایی گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد. الف: کنترل ب: عفونی ج: عفونی+سیپروفلوکساسین د: عفونی+سیپروفلوکساسین+جنسینگ. عفونت *E.coli* باعث افزایش قابل توجهی در چروکیدگی آسینی‌ها و انفیلتراسیون سلول‌های التهابی به فضای مابین آسینی‌ها شده است. پرزدار شدن آسینی‌ها که به دلیل هایپرپلازی اپی‌تلیوم ایجاد شده، در گروه عفونی به خوبی مشهود است. به میزان ترشحات موجود در آسینی‌ها توجه کنید. این ترشحات در گروه عفونی به شدت کاهش یافته است. تجویز هم‌زمان جنسینگ و سیپروفلوکساسین سبب کاهش میزان التهاب به صورت معنی‌داری نسبت به گروه عفونی شده است. (رنگ‌آمیزی H&E، بزرگنمایی: ۱۰۰x، scale bar ۲۰۰μm)

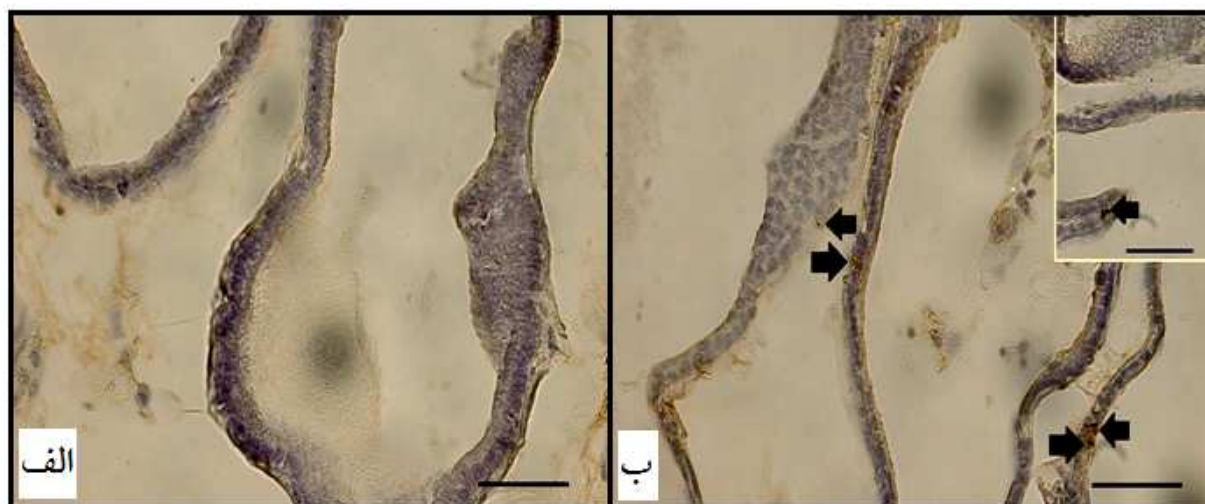
۴-۴- نتایج مربوط به میزان آپتوز در اپی تلیوم اپی دیدیم و پروستات

آپتوز اپی دیدیم: همان طور که جدول شماره (۴-۴) نشان می دهد، میزان آپتوز ایجاد شده در گروه های سیپروفلوکساسین، عفونی و عفونی+سیپروفلوکساسین نسبت به گروه کنترل، شم و جنسینگ به طور قابل توجهی افزایش یافته است ($p < 0.05$) (شکل ۴-۵). همچنین کاهش آپتوز در گروه عفونی+سیپروفلوکساسین+جنسینگ نسبت به گروه عفونی و عفونی+سیپروفلوکساسین معنی دار بوده اما با گروه سیپروفلوکساسین تفاوت قابل توجهی نداشته است. میزان آپتوز در گروه سیپروفلوکساسین+جنسینگ نسبت به گروه سیپروفلوکساسین و هم چنین گروه عفونی+جنسینگ نسبت به گروه عفونی کاهش معنی داری داشته است. بین گروه های کنترل، شم و جنسینگ هم چنین بین گروه های سیپروفلوکساسین، عفونی و عفونی+سیپروفلوکساسین تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

آپتوز پروستات: همان طور که در تصویر شماره (۴-۶) مشاهده می کنید، بررسی سلول های آپتوتیک در گروه سیپروفلوکساسین نشان دهنده ی افزایش معنی دار آپتوز نسبت به گروه کنترل بود ($p < 0.05$). هم چنین این میزان در گروه عفونی و عفونی+سیپروفلوکساسین به صورت قابل توجهی نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. تفاوت مشاهده شده بین گروه های سیپروفلوکساسین، عفونی و عفونی+سیپروفلوکساسین معنی دار نبود. کاهش تعداد سلول های آپتوتیک در گروه عفونی+سیپروفلوکساسین+جنسینگ با گروه عفونی+سیپروفلوکساسین معنی دار نبوده ولی تفاوت قابل توجهی با گروه عفونی داشت ($p < 0.05$). استفاده از آنتی اکسیدان جنسینگ هم زمان با سیپروفلوکساسین منجر به کاهش معنی دار تعداد سلول های آپتوتیک نسبت به گروه سیپروفلوکساسین شد. همچنین تزریق جنسینگ به گروه عفونی نیز باعث کاهش چشم گیر آپتوز نسبت به گروه عفونی شد ($p < 0.05$).



شکل ۴-۵: تصاویر میکروسکوپی از سلول‌های اپی‌تلیال اپی‌دیدیم پس از رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی (TUNEL). نوک پیکان سلول‌های آپوتوتیک را نشان می‌دهد. الف: کنترل ب: عفونی ج: عفونی+سیپروفلوکساسین د: عفونی+سیپروفلوکساسین+جنسینگ. تصویر ب و ج بیانگر افزایش چشم‌گیر میزان آپتوز در گروه عفونی و هم‌چنین عفونی+سیپروفلوکساسین است. استفاده از جنسینگ باعث کاهش قابل توجهی در میزان آپتوز در اپی‌تلیوم اپی‌دیدیم رت‌های عفونی دریافت‌کننده‌ی سیپروفلوکساسین شده است. (رنگ‌آمیزی تانل، بزرگمایی $\times 400$ ، scale bar $50\mu m$)



شکل ۴-۶: تصاویر میکروسکوپی از سلول‌های اپی‌تلیال پروستات پس از رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی (TUNEL). الف) کنترل ب) سیپروفلوکساسین. نوک پیکان سلول‌های آپوتوتیک را نشان می‌دهد. به افزایش قابل توجه آپتوز در گروه دریافت‌کننده سیپروفلوکساسین توجه کنید. (رنگ‌آمیزی تانل، بزرگنمایی ۴۰۰x، scale bar ۵۰ μm)

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

۵-۱- بحث مربوط به تغییرات مورفومتریک و شدت التهاب در اپی دیدیم:

اپی دیدیم مکانی برای ذخیره و بلوغ اسپرم محسوب می شود و نقش مهمی در باروری مردان ایفا می کند. بلوغ اسپرم در اپی دیدیم شامل آغاز تحرک و کسب قابلیت باروری می باشد. در اپی دیدیم است که پروتئین های متعددی ترشح می شوند و ترشح این پروتئین ها به هورمون آندروژن وابسته است (۶۱). آسیب اپی دیدیم در عدم بلوغ مناسب اسپرم ها نقش قابل توجهی دارد. بر اساس تحقیقات انجام شده باکتری ها با ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو و آسیب رساندن به غده پروستات، سمینالوزیکل و اپی دیدیم به طور غیر مستقیم عملکرد اسپرم را تحت تأثیر قرار داده و مختل می کنند (۱۰).

یافته های این مطالعه نشان داد که عفونت *E.coli* باعث ایجاد اثرات تخریبی قابل توجهی بر اپی دیدیم رت ها شده است که از آن جمله می توان به افزایش معنی دار شدت التهاب و کاهش قابل توجه ارتفاع اپی تلیوم، قطر توبول های اپی دیدیم و همچنین طول و تعداد استریوسیلیاها در سطح داخلی توبول ها اشاره کرد.

بر اساس مطالعات گذشته، *UPEC* باعث ایجاد اختلال در اتصالات محکم سلول ها در اپی تلیوم اپی دیدیم و کاهش سطح تستوسترون می شود. این اختلال در اتصالات محکم سلولی، منجر به ریزش سلول های اپی تلیوم اپی دیدیم به درون لومن و در نهایت کاهش معنی دار در قطر و ضخامت توبول های اپی دیدیم می شود (۳۹، ۶۲). همچنین مطالعات قبلی بیان نمودند که کاهش هورمون تستوسترون با ایجاد تغییرات بافتی در اپی دیدیم همراه است. سلول های اپی تلیالی مجرای اپی دیدیم دارای رسپتورهای آندروژنی هستند و شاید به همین علت به تغییرات هورمونی حساسیت زیادی دارند (۶۳). *Jain* و همکاران در سال ۲۰۱۲ کاهش سطوح آندروژن را یکی از دلایل اصلی در کاهش قابل ملاحظه قطر توبول های اپی دیدیم بیان کردند. بر طبق مشاهدات

آن‌ها کاهش هورمون تستوسترون منجر به کاهش وزن اپی‌دیدیم رت‌ها شده‌است و علت اصلی این کاهش وزن، کوچک شدن اندازه توبول‌ها و همچنین کاهش تعداد سلول‌های زایا بوده است (۶۴).

Ludwig و همکاران در سال ۲۰۰۲، متورم شدن اپی‌دیدیم، تخریب اپی‌تلیوم و انفیلتراسیون سلول‌های التهابی به فضای مابین توبول‌ها را در اثر عفونت با *E.coli* گزارش کردند (۴۵).

بر اساس مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۳، سه روز پس از تزریق *E.Coli* در موش‌ها، اپی‌دیدیم‌ها قرمز شده و این سرخی نشان دهنده تغییرات هیستوپاتولوژیکی ایجاد شده در این ارگان بود. بر طبق بررسی‌های میکروسکوپی، فضای بینابینی اپی‌دیدیم‌ها، به دلیل وجود تعداد بالایی از سلول‌های التهابی دچار تورم و آماس شده‌اند. همچنین تغییراتی در اپی‌تلیوم اپی‌دیدیم موش‌های عفونی شده با UPEC (کاهش استریوسیلیاها) مشاهده شد (۳۹).

آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل نقش مهمی که در درمان بیماری‌های عفونی از خود به جای می‌گذارند، کمک ارزنده‌ای به زندگی بشری کرده‌اند. با توجه به اینکه ممکن است این داروها بر سیستم‌های مختلف بدن تأثیرگذار باشند، در این بخش به اثرات سیپروفلوکساسین بر روی اپی‌دیدیم اشاره می‌کنیم چراکه هر نوع اثر تخریبی بر سلول‌های اپی‌تلیالی اپی‌دیدیم منجر به کاهش بلوغ اسپرم و در نهایت کاهش میزان باروری مردان می‌شود.

در مطالعات قبلی بیشتر به بررسی اثر سیپروفلوکساسین بر بافت بیضه پرداخته شده و تحقیقات زیادی بر روی اپی‌دیدیم انجام نشده است. بر طبق نتایج حاصل از این مطالعات سیپروفلوکساسین اثر تخریبی شدیدی بر بافت بیضه داشته است که از آن جمله می‌توان به کاهش قطر لوله‌های منی‌ساز، فیروز بافت بینابینی، تخریب سلول‌های لایدیگ و کاهش سطح هورمون تستوسترون اشاره کرد (۶۵).

یافته‌های مطالعه ما نیز تغییر قابل توجهی را در قطر و ارتفاع اپی‌دیدیم در گروه سیپروفلوکساسین نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. این امر می‌تواند به دلیل کاهش سطح هورمون تستوسترون در اثر استفاده از این آنتی‌بیوتیک باشد. اما در میزان شدت التهاب در گروه سیپروفلوکساسین نسبت به گروه کنترل تغییر معنی‌داری مشاهده نشد. با توجه به اینکه در بافت بیضه سلول‌های رده اسپرماتوژنیک همیشه در حال تکثیر و تمایز هستند و سلول‌هایی که دائماً در حال تکثیر هستند نسبت به تغییرات محیطی حساس‌ترند ولی اپی‌دیدیم نسبت به بیضه بافت تمایز یافته‌ای بوده و تکثیر سلولی در آنجا کمتر اتفاق می‌افتد، بنابراین نسبت به اثرات مضر سیپروفلوکساسین تخریب کمتری را نسبت به بافت بیضه نشان می‌دهد و در مقابل شرایط استرس اکسیداتیو که توسط سیپروفلوکساسین ایجاد می‌شود مقاوم‌تر است.

سیپروفلوکساسین می‌تواند با ممانعت از تکثیر باکتری *E.coli*، اثرات تخریبی این باکتری بر روی اپی‌دیدیم را تا حدی کاهش دهد که این امر در نتایج حاصل از ارتفاع اپی‌تلیوم و قطر توبول مشهود است. اما با توجه به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش سطح تستوسترون در طی استفاده از این آنتی‌بیوتیک همچنان بخشی از تغییرات زیان‌بار بافتی به صورت قابل توجهی باقی می‌ماند. همچنان که در مطالعه حاضر کاهش معنی‌داری در میزان انفیلتراسیون سلول‌های التهابی و ادم ایجاد شده مابین توبول‌های اپی‌دیدیم در گروه عفونی+ سیپروفلوکساسین در مقایسه با گروه عفونی نشان داده نشد.

مطالعه حاضر نشان داد که مصرف هم‌زمان جنسینگ با سیپروفلوکساسین در رت‌های عفونی به طور معنی‌داری باعث بهبود تغییرات بافتی ناشی از عفونت و آنتی‌بیوتیک در اپی‌دیدیم شد. به نظر می‌رسد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی جنسینگ در بهبود آسیب‌های بافتی ناشی از *E.coli* و سیپروفلوکساسین در اپی‌دیدیم نقش برجسته‌ای دارد.

Yong-Ho Kim و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش داده‌اند که جنسینگ قرمز کره‌ای می‌تواند با سرکوب فرآیند تولید سوپراکسید اختلال عملکرد بیضه را بهبود بخشد (۴).

Edzard Ernst در سال ۲۰۱۰ به برخی از مکانیسم‌های عملکردی جنسینگ همچون خاصیت ضدالتهابی آن اشاره کرده است (۳۰). همچنین اسکندری و همکاران در طی مطالعه‌ای، اثرات حفاظتی جنسینگ را بر کیفیت اسپرم در برابر اثرات سیتوتوکسیک عفونت بیضه و اپی‌دیدیم تأیید کردند (۵۷).

۵-۲- بحث مربوط به تغییرات مورفومتریک پروستات:

پروستات بزرگترین غده فرعی دستگاه تناسلی مردان است. ترشحات این غده تا حدود ۳۰ درصد از حجم مایع منی را تشکیل می‌دهد. مایع ترشح شده از غده پروستات شامل مقادیر بالایی از کلسیم، روی، فسفات، سیتریک‌اسید و سایر ترکیبات مهم و حیاتی برای عملکرد اسپرم است. واضح است که هرگونه آسیب به پروستات منجر به کاهش تولید این ترکیبات و در نهایت آسیب به اسپرم‌ها خواهد شد. براساس مطالعات گذشته حجم ترشحات پروستات در طی عفونت غدد فرعی مردانه کاهش می‌یابد. کاهش حجم مایع منی می‌تواند تأثیر منفی بر باروری مردان بگذارد (۶۶).

بر اساس یافته‌های حاصل از مطالعه حاضر، عفونت *E.coli* باعث افزایش شدت التهاب به صورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل شده است. فیروز گسترده، انفیلتراسیون سلول‌های التهابی و چروکیدگی آسینی‌های پروستات در رت‌های عفونی به طور قابل توجهی شدت پیدا کرده‌اند. مطالعات Elkahwaji و همکاران در سال ۲۰۰۷ این یافته را تأیید می‌کند. آن‌ها نشان دادند که عفونت ایجاد شده توسط *E.coli* منجر به ادم بافت

بینابینی و انفیلتراسیون سلول‌های التهابی و ریخته شدن سلول‌های اپی‌تلیالی پروستات به درون لومن مجرا می‌شود (۳۷).

چروکیده به نظر رسیدن آسینی‌های پروستات احتمالاً به دلیل هایپرپلازی اپی‌تلیوم غده‌ای پروستات در چندین نقطه می‌باشد که با افزایش ضخامت سلول‌های لایه‌ی اپی‌تلیوم و پرزدار کردن این لایه همراه است. در عفونت پروستات، لکوسیت‌ها و سلول‌های فاگوسیت منتشر شده به فضای بینابینی با تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS)، باکتری‌ها و سلول‌های آلوده به باکتری را از بین می‌برند. اما تولید بیش از حد ROS (که در اثر حضور طولانی مدت باکتری‌ها به وجود می‌آید) می‌تواند منجر به آسیب DNA سلولی، پروتئین‌ها و لیپیدها شود. به دلیل مرگ سلولی ناشی از آسیب وارد شده و تکثیر سلولی جبرانی، ممکن است به صورت خاص جمعیت سلول‌های progenitor نسبت به اثرات جهش‌زای استرس اکسیداتیو آسیب‌پذیر شوند و هایپرپلازی اتفاق بیفتد.

درمان پروستاتیت مشکل است. اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها نمی‌توانند از سد اپی‌تلیالی پروستات عبور کنند و دلیل اصلی آن این است که تنها داروهایی با وزن مولکولی پایین، محلول در چربی و آن‌هایی که به طور محکم به پروتئین‌های پلازما متصل نباشند توانایی نفوذ به غشای اپی‌تلیالی پروستات و عبور از سد خونی-پروستاتی را دارند. در نتیجه درمان طولانی‌مدت و با دوز بالای آنتی‌بیوتیک برای ریشه‌کن کردن باکتری‌ها نیاز است. از طرف دیگر استفاده طولانی مدت از درمان آنتی‌بیوتیک می‌تواند اثرات مضرى همچون آسیب‌های گوارشی، قلبی و عروقی و عوارض پوستی به دنبال داشته باشد و این مسئله بحث درمان را مشکل‌تر می‌کند (۵۵). شناخته شده‌ترین آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در درمان پروستاتیت، سیپروفلوکساسین است که همه مشخصات مربوط به نفوذ به بافت پروستات را دارا می‌باشد.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که سیپروفلوکساسین می‌تواند با سرکوب باکتری میزان شدت التهاب را کاهش دهد اما همان‌طور که قبلاً گفته شد این دارو با کاهش میزان تستوسترون سرم و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌تواند اثر منفی بر آسینی‌های پروستات گذاشته و منجر به ریزش سلول‌های اپی‌تلیومی به داخل لومن آسینی‌ها شود (۶۲). از آنجایی که این دارو به صورت معمول در مراکز درمانی جهت درمان برخی از بیماری‌ها به خصوص بیماری‌های دستگاه ادراری تناسلی تجویز می‌گردد باید به میزان مصرف دارو در دوره‌های خاص درمانی دقت شود.

بر اساس مطالعه انجام شده توسط Oremosu و همکاران در سال ۲۰۱۳، جنسینگ سطح هورمون‌های جنسی (تستوسترون، LH و FSH) را افزایش داده و این موضوع نشان‌دهنده تأثیر جنسینگ بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-بیضه می‌باشد (۶۷، ۶۸).

استفاده از آنتی‌اکسیدان جنسینگ همراه با سیپروفلوکساسین در رت‌های عفونی در مطالعه حاضر، به‌طور چشم‌گیری شدت التهاب را کاهش داده است. این یافته نتایج حاصل از مطالعات Kim و همکاران در سال ۲۰۱۲ را تأیید می‌کند (۵۳).

در مطالعه که Choi و همکاران در سال ۲۰۰۷ انجام دادند، از سیپروفلوکساسین به عنوان دارویی مؤثر در درمان CBP استفاده شد و همچنین برای کاهش اثرات جانبی سیپروفلوکساسین، جنسینگ و Urovaxom مورد بررسی قرار گرفتند. براساس نتایج آن‌ها، درمان ترکیبی جنسینگ با سیپروفلوکساسین و همچنین Urovaxom با سیپروفلوکساسین اثرات قابل توجهی بر درمان CBP داشت (۵۱).

بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نیز، استفاده ترکیبی از سیپروفلوکساسین و جنسینگ در درمان رت‌های عفونی شده با *E.coli* تأثیر بهتری بر روند درمان نسبت به استفاده جداگانه از هر کدام از آن‌ها داشته است. همان‌طور که در بخش نتایج گفته شد گروه عفونی+سیپروفلوکساسین و همچنین گروه عفونی+جنسینگ کاهش معنی‌داری در میزان شدت التهاب نسبت به گروه عفونی نداشتند اما این کاهش در گروه عفونی+سیپروفلوکساسین+جنسینگ نسبت به گروه عفونی معنی‌دار بود. به نظر می‌رسد به دلیل اثربخش بودن داروی سیپروفلوکساسین در درمان عفونت مجاری ادراری تناسلی و همچنین تأثیر حفاظتی جنسینگ بر اثرات جانبی سیپروفلوکساسین، استفاده ترکیبی از این دو در درمان UTI بتواند در بهبود میزان باروری در مردان مؤثر باشد.

۵-۳- بحث مربوط به تغییرات آپوتوتیک در پروستات و اپی‌دیدیم:

نتایج رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی بافت اپی‌دیدیم و پروستات نشان داد که میزان سلول‌های آپوتوتیک اپی‌تلیوم مجرای اپی‌دیدیم و آسینی‌های پروستات در گروه عفونی و گروه تحت درمان با سیپروفلوکساسین به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است. مطالعات زیادی بر روی اثرات آپوتوتیک سیپروفلوکساسین و همچنین عفونت *E.coli* در بافت بیضه و همین‌طور پارامترهای اسپرم صورت گرفته است (۲، ۱۲، ۴۰، ۴۳) اما تاکنون مطالعه‌ای بر روی پروستات و بخش سر اپی‌دیدیم به جهت تشخیص اثرات سیتوتوکسیک و آپوتوتیک سیپروفلوکساسین انجام نشده است.

نتایج به دست آمده از مطالعه انجام گرفته در سال ۲۰۰۸ بر روی بیست سر موش صحرایی نژاد ویستار نشان‌دهنده پتانسیل گنادوتوکسیک سیپروفلوکساسین بوده است. یکی از دلایل این اثر سوء تداخل این

آنتی‌بیوتیک با فرآیند تولید انرژی مورد نیاز برای تحرک اسپرم عنوان شده است (۱۳). بر طبق مطالعات *genotoxicity* در محیط *in vivo* در سال ۲۰۱۲، سیپروفلوکساسین به‌طور قابل توجهی عملکرد و ساختار بیضه‌ها را تحت تأثیر قرار داده و منجر به کاهش تولید روزانه اسپرم و تحرک آن‌ها در رت‌ها شده است (۱۲).

سیپروفلوکساسین کاسپاز ۳ را فعال می‌کند و این امر منجر به افزایش آپوپتوز سلول‌های زایا در مردان می‌شود. مطالعه *Khaki* و همکاران در سال ۱۳۸۵، افزایش مرگ سلولی را در سلول‌های رده اسپرماتوژنیک رت‌های دریافت کننده سیپروفلوکساسین نشان داد (۲).

در فرآیند آپوپتوز *ROS* به عنوان یک میانجی مهم عمل می‌کند و به نظر می‌رسد که عفونت *E.coli* و سیپروفلوکساسین از طریق تولید بیش از حد *ROS* می‌توانند باعث القای آپوپتوز در سلول‌های بافت پروستات و اپی‌دیدیم شوند (۳۶).

سوپراکسید، اکسیژنی فعال حاصل از نشت الکترون‌ها از زنجیره انتقال الکترون به اکسیژن است و پیش‌ساز بسیاری از اشکال دیگر *ROS* می‌باشد. *Collins* و همکاران در سال ۲۰۱۳ تولید سوپراکسید میتوکندریایی را پس از درمان با انواع آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله سیپروفلوکساسین مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از مطالعه آن‌ها، افزایش تولید سوپراکسید پس از دریافت آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین را تأیید می‌کند. میتوکندری‌ها در سلول‌های پستانداران، بزرگترین منبع *ROS* درون سلولی هستند. سیپروفلوکساسین با تخریب عملکرد این اندامک سلولی باعث افزایش بیش از حد *ROS* و در نهایت آسیب اکسیداتیو می‌شود (۶۹).

چنانچه قبلاً گفته شد عفونت E.coli و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین باعث کاهش سطح سرمی هورمون تستوسترون می‌شوند. با کاهش این هورمون میزان فعالیت سلول در بافت‌های مذکور کاهش یافته و در نهایت سلول به سمت مرگ کشیده می‌شود و به دنبال آن آپوپتوز نیز افزایش می‌یابد (۳۶، ۷۰).

در مطالعه حاضر استفاده از جنسینگ در گروه‌های سیپروفلوکساسین، عفونی و عفونی+سیپروفلوکساسین منجر به کاهش قابل توجه میزان آپوپتوز در اپی‌دیدیم و پروستات رت‌ها شده است. مطالعات قبلی، اثرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آپوپتوتیک جنسینگ را بر بافت‌های دیگر بدن از جمله ریه، سلول‌های مغزی و بافت بیضه تأیید کرده‌اند (۵۴، ۵۷). Kim و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ به اثرات آنتی‌اکسیدانی جنسینگ اشاره کرده‌اند. بر اساس نتایج حاصل از مطالعه آن‌ها جنسینگ ماده‌ای مؤثر در بهبود شرایط استرس اکسیداتیو است (۵۲).

به نظر می‌رسد جنسینگ با اثرات آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی که دارد می‌تواند با سرکوب ROS اضافی که در طی روند درمان با سیپروفلوکساسین و همچنین در طول دوره‌ی عفونت ایجاد می‌شود تا حد قابل توجهی اثرات آپوپتوتیک حاصل از این دو را کاهش دهد.

۵-۴- نتیجه‌گیری کلی:

این مطالعه نشان داد که عفونت E.coli و همچنین آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین می‌توانند با افزایش تغییرات مورفومتریک و آپوپتوتیک در بافت‌های پروستات و اپی‌دیدیم باعث ایجاد اثرات منفی در باروری شوند. از طرفی آنتی‌اکسیدان جنسینگ با اثرات ضدالتهابی و ضدآپوپتوتیک خود توانسته به صورت قابل توجهی باعث بهبود این تغییرات شود. از آنجایی که استفاده از آنتی‌بیوتیک به عنوان یک درمان استاندارد طبایی مخصوصاً در

عفونت پروستات محسوب می‌شود، استفاده ترکیبی از سیپروفلوکساسین و جنسینگ احتمالاً می‌تواند باعث کاهش اثرات جانبی و بهبود روند درمان در موارد عفونت دستگاه تناسلی مردانه شود.

۵-۵- پیشنهادات:

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، موارد زیر برای مطالعات بعدی پیشنهاد می‌شود:

- بررسی تغییرات آپوپتوزی حاصل از سیپروفلوکساسین و همچنین بررسی اثرات آنتی‌آپوپتوتیک جنسینگ قرمز کره‌ای بر روی سمینالوزیکل
- بررسی اثرات سیپروفلوکساسین در مدت زمان‌ها و با دوزهای متفاوت بر سیستم تناسلی مرد
- مقایسه میزان اثر سیپروفلوکساسین بر روی بخش‌های مختلف اپی‌دیدیم (قطعه ابتدایی، سر، تنه و دم)
- مقایسه میزان اثر سیپروفلوکساسین و عفونت E.coli در لوب‌های مختلف پروستات

منابع

مورد مطالعه

1. Fanaei H, Mardaneh J, Khayat S. An overview of the role of bacterial infection in male infertility. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*. 2013;2(4):227-34.
2. KHAKI AA, HEYDARI M, GHAFARI NM, Khaki A, Rejaie F. Evaluation of Ciprofloxacin Cytotoxic Effect in Rat Testis. *SCIENTIFIC JOURNAL OF HAMADAN UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCES AND HEALTH SERVICES*. 2007.
3. Jacobo P, Guazzone VA, Theas MS, Lustig L. Testicular autoimmunity. *Autoimmunity reviews*. 2011;10(4):201-4.
4. Kim Y-H, Kim G-H, Shin J-H, Kim K-S, Lim J-S. Effect of korean red ginseng on testicular tissue injury after torsion and detorsion. *Korean journal of urology*. 2010;51(11):794-9.
5. WADILE RG. MALE GENITOURINARY TRACT INFECTIONS RELATIONSHIP WITH INFERTILITY: A BACTERIOLOGICAL STUDY. *International Journal of Pharma & Bio Sciences*. 2013;4(4).
6. Jun Y-T, Kim H-J, Song M-J, Lim J-H, Lee D-G, Han K-J, et al. In vitro effects of ciprofloxacin and roxithromycin on apoptosis of Jurkat T lymphocytes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;47(3):1161-4.
7. Reece RJ, Maxwell A. Probing the limits of the DNA breakage-reunion domain of the Escherichia coli DNA gyrase A protein. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(6):3540-6.
8. Oliveira F, Paludo K, Arend L, Farah S, Pedrosa F, Souza E, et al. Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic Escherichia coli strains. *Genet Mol Res*. 2011;10(4):4114-25.
9. Malani PN. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. *JAMA*. 2010;304(18):2067-71.
10. Ochsendorf F. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Human Reproduction Update*. 1999;5(5):399-420.
11. Goswami M, Mangoli SH, Jawali N. Antibiotics and antioxidants: friends or foes during therapy? *BARC Newsletter*. 2011;323:42-6.
12. Elias A, Nelson B. Toxicological Effect of Ciprofloxacin on Testicular Function of Male Guinea Pigs. 2012.
13. Khaki A, Heidari M, Ghaffari Novin M, Khaki AA. Adverse effects of ciprofloxacin on testis apoptosis and sperm parameters in rats. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 2008;6(2):71-6.
14. Babaei Abraki S, Chavoshi-Nejad S. Mitochondrial Defects and Oxidative Stress in Alzheimer Disease. *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam*. 2014;2(1):85-94.
15. Agarwal A, Sekhon LH. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Human Fertility*. 2010;13(4):217-25.
16. Fanaei H, Azizi Y, Khayat S. A Review: Role of oxidative stress in male infertility. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*. 2013;3(2):93-103.
17. Lu Y. Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) cause impairment of spermatogenesis by inducing programmed necrosis. 2011.
18. Honardoost M, Soleimanjahi H, Rajaei F. Apoptosis: programmed cell death. 2013.
19. Hashemi M, ghavami S, Karami tehrani F. apoptosis, programmed cell death. *Tabibe shargh*. 2003;1.
20. Montazeri F, Rahgozar S, Ghaedi K. Apoptosis and cytosolic organelles. *Genetics in the 3rd millennium*. 2011;9(1):2300-12.
21. Hashemi M, Ghavami S. Methods of Studying the Apoptosis. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 2008;7(1):71-8.

22. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology*. 1992;119(3):493-501.
23. Showell MG, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011;1(1).
24. Gallardo JM. [Evaluation of antioxidant system in normal semen]. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*. 2006;59(1):42-7.
25. Hosseini A, Zare S, GHADERI PF, AHMADI A. Effects of Vitamin E and Ginseng Extract on Fertility Changes Induced by Cyclophosphamide in Rats. *JOURNAL OF REPRODUCTION AND INFERTILITY*. 2011.
26. Cheng L-Q, Kim MK, Lee J-W, Lee Y-J, Yang D-C. Conversion of major ginsenoside Rb1 to ginsenoside F2 by *Caulobacter leidyia*. *Biotechnology letters*. 2006;28(14):1121-7.
27. Mohammadi F, Nikzad H, Taherian A, Mahabadi JA, Salehi M. Effects of Herbal Medicine on Male Infertility. *World Health*. 2013;15:10.
28. Helms S. Cancer prevention and therapeutics: Panax ginseng. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*. 2004;9(3):259-74.
29. Shin HR, Kim JY, Yun TK, Morgan G, Vainio H. The cancer-preventive potential of Panax ginseng: a review of human and experimental evidence. *Cancer Causes & Control*. 2000;11(6):565-76.
30. Ernst E. Panax ginseng: an overview of the clinical evidence. *J Ginseng Res*. 2010;34(4):259-63.
31. Park S-Y, Seo J-H, Kim J-K, Park K-H. Effects of Korean Red Ginseng on Hearing and Blood Glucose Levels in Steroid Therapy for Sudden Sensorineural Hearing Loss. *Clinical and experimental otorhinolaryngology*. 2014;7(3):170-4.
32. Gartner LP, Hiatt JL. *Colour textbook of histology*. London: WB Saunders. 2001.
33. Mescher AL. *Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas*: McGraw-hill medical New York; 2010.
34. J SR. *Histology* 2005.
35. Robaire B, Hinton BT, Orgebin-Crist M-C. The epididymis. *Physiology of reproduction*. 2006;3:1071-148.
36. Bustos-Obregón E, Esponda P. Ageing induces apoptosis and increases HSP70 Stress Protein in the epididymis of *Octodon degus*. *International Journal of Morphology*. 2004;22(1):29-34.
37. Elkahwaji JE, Zhong W, Hopkins WJ, Bushman W. Chronic bacterial infection and inflammation incite reactive hyperplasia in a mouse model of chronic prostatitis. *The Prostate*. 2007;67(1):14-21.
38. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Human reproduction update*. 2008;14(3):243-58.
39. Lang T, Dechant M, Sanchez V, Wistuba J, Boiani M, Pilatz A, et al. Structural and Functional Integrity of Spermatozoa Is Compromised as a Consequence of Acute Uropathogenic *E. coli*-Associated Epididymitis. *Biology of reproduction*. 2013;biolreprod. 113.110379.
40. Demir A, Türker P, Önel FF, Sirvanci S, Findik A, Tarcan T. Effect of experimentally induced *Escherichia coli* epididymo-orchitis and ciprofloxacin treatment on rat spermatogenesis. *International journal of urology*. 2007;14(3):268-72.
41. Nashwa A, Kawkab A, Mounair S. The protective effect of ginger and N-acetyl cysteine on ciprofloxacin-induced reproductive toxicity in male rats. *J Am Sci*. 2011;7:741-52.
42. Schrader SM. Man and the workplace:: Assessing his reproductive health. *Chemical Health and Safety*. 2003;10(5):11-6.
43. Zhang J-H, Zhang Y, Herman B. Caspases, apoptosis and aging. *Ageing research reviews*. 2003;2(4):357-66.

44. Lee YS, Han CH, Kang SH, LEE SJ, Kim SW, Shin OR, et al. Synergistic effect between catechin and ciprofloxacin on chronic bacterial prostatitis rat model. *International journal of urology*. 2005;12(4):383-9.
45. Ludwig M, Johannes S, Bergmann M, Failing K, Schiefer H, Weidner W. Experimental Escherichia coli epididymitis in rats: a model to assess the outcome of antibiotic treatment. *BJU international*. 2002;90(9):933-8.
46. Zobeiri F, Sadrkhanlou R-A, Salami S, Mardani K, Ahmadi A, editors. The effect of ciprofloxacin on sperm DNA damage, fertility potential and early embryonic development in NMRI mice. *Veterinary Research Forum*; 2012.
47. Goswami M, Mangoli SH, Jawali N. Effects of glutathione and ascorbic acid on streptomycin sensitivity of Escherichia coli. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(3):1119-22.
48. Kang KS, Kim HY, Pyo JS, Yokozawa T. Increase in the free radical scavenging activity of ginseng by heat-processing. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2006;29(4):750-4.
49. Hwang S-Y, Sohn S-H, Wee J-J, Yang J-B, Kyung J-S, Kwak Y-S, et al. Panax ginseng improves senile testicular function in rats. *J Ginseng Res*. 2010;34:327-35.
50. Vayghan HJ, Ghadimi SS, Nourazarian AR. Preventive and Therapeutic Roles of Ginseng-Focus on Colon Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014;15(2):585-8.
51. Choi Y-S, Cho Y-H, Han C-H. Synergistic effect between Ginsenoside or Urovaxom® with ciprofloxacin on chronic bacterial prostatitis rat model. *Korean Journal of Urology*. 2007;48(8):849-57.
52. Kim E-H, Lee M-J, Kim I-H, Pyo S, Choi K-T, Rhee D-K. Anti-apoptotic effects of red ginseng on oxidative stress induced by hydrogen peroxide in SK-N-SH cells. *J Ginseng Res*. 2010;34:138-44.
53. Kim SH, Ha U-S, Sohn DW, Lee S-J, Kim HW, Han CH, et al. Preventive effect of ginsenoside on chronic bacterial prostatitis. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2012;18(5):709-14.
54. Nguyen CT, Luong TT, Kim GL, Pyo S, Rhee DK. Korean Red Ginseng inhibits apoptosis in neuroblastoma cells via estrogen receptor beta-mediated phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Ginseng Res*. 2015 Jan;39(1):69-75. PubMed PMID: 25535479. Pubmed Central PMCID: PMC4268566. Epub 2014/12/24. eng.
55. Sohn DW, Han CH, Jung YS, Kim SI, Kim SW, Cho Y-H. Anti-inflammatory and antimicrobial effects of garlic and synergistic effect between garlic and ciprofloxacin in a chronic bacterial prostatitis rat model. *International journal of antimicrobial agents*. 2009;34(3):215-9.
56. Kim SH, Ha U-S, Lee HR, Sohn DW, Lee S-J, Kim HW, et al. Do Escherichia coli extract and cranberry exert preventive effects on chronic bacterial prostatitis? Pilot study using an animal model. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2011;17(3):322-6.
57. Eskandari M, Jani S, Shokri S, Zeiyghami H, A Y. Protective effects of chinese Red ginseng on the spermatogenic cells apoptosis and sperm quality of epididymo-orchitis in the rat model. 13th World Congress in Fetal Medicine; Sunday 29th June 2014; Nice, France 2014.
58. Jantos C, Altmannsberger M, Weidner W, Schiefer HG. Acute and chronic bacterial prostatitis due to E. coli. Description of an animal model. *Urological research*. 1990;18(3):207-11. PubMed PMID: 2204173. Epub 1990/01/01. eng.
59. Liou C-J, Li M-L, Tseng J. Intraperitoneal injection of ginseng extract enhances both immunoglobulin and cytokine production in mice. *The American journal of Chinese medicine*. 2004;32(01):75-88.

60. Sanati E, Nikmanesh M. Comparative study of the effects of gentamicin, neomycin, streptomycin and ofloxacin antibiotics on sperm parameters and testis apoptosis in rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2008;11(13):1683-9.
61. Jasemi M, Saki G, Rahim F. The Effect of *Centella Asiatica* Alcoholic Extract on the Serum Levels of Testosterone FSH and LH in Male Wistar Rat. 2. 2009;16(1):6-11. eng %@ 9 %[2009.
62. Yaghmaei P, Sekhavati S. The role and effect of finasteride on the spermatogenesis, prostate gland and epididym of mature NMRI mouse in in vivo and in vitro conditions. *Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity-Tehran Medical Branch*. 2010;20(3):148-56.
63. MOHAMMAD GF, Faghani M, Falah Karkan M. The protective effect of melatonin on sperm parameters, epididymis and seminal vesicle morphology in adult mouse treated with busulfan. *JOURNAL OF IRANIAN ANATOMICAL SCIENCES*. 2010.
64. Nisha Jain, Arti Sharma, Joshi S. Cauda Epididymal Lesion in Male Rats after Subchronic Exposure of Malathion. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2012 April – June Volume 3(Issue 2):190.
65. Zobeiri F, Sadrkhanlou R-A, Salami S, Mardani K. Long-Term Effect of Ciprofloxacin on Testicular Tissue: Evidence for Biochemical and Histochemical Changes. *International journal of fertility & sterility*. 2013;6(4):294.
66. Alshahrani S, McGill J, Agarwal A. Prostatitis and male infertility. *Journal of reproductive immunology*. 2013;100(1):30-6.
67. Oremosu A, Arowosaye V, Akang E, Bassey R. Effects of *Cissus populnea* and *Panax ginseng* on Flutamide-Induced Testicular Defect in Pre-Pubertal Male Rats. *British Journal of Medicine & Medical Research*. 2013;3(1):173-81.
68. Ebrahimi-kalan A, Soleimani Rad J, Roshangar L, Khaki A, Mohammadnejad D. Effect of ginsenoside as a phytoestrogen on busulfan-induced disorders in semen parameter. 2011.
69. Kalghatgi S, Spina CS, Costello JC, Liesa M, Morones-Ramirez JR, Slomovic S, et al. Bactericidal antibiotics induce mitochondrial dysfunction and oxidative damage in mammalian cells. *Science translational medicine*. 2013;5(192):192ra85-ra85.
70. Jara M, Carballada R, Esponda P. Age-induced apoptosis in the male genital tract of the mouse. *Reproduction*. 2004;127(3):359-66.

The protective effect of Korean Red Ginseng on reproductive organs of UPEC infected male rat treated by ciprofloxacin

Maryam Miri^۱ Reza Shirazi^۲ Saeed Shokri^۳ Shahram Darabi^۱ Mahmood AlipourHeidari^۲

Department of Anatomy^۱ and Biostatistics^۲, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Department of Anatomy, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran^۲

Department of Anatomy, Zanzan University of Medical Sciences, Zanzan, Iran^۳

Objective: Genitourinary tract infection plays significant role in male infertility. Infection of reproductive organs such as prostate and epididymis impair their function and indirectly affect the male fertility. The general aim of this study was to investigate the protective effect of Korean red ginseng on prostate and epididymis of infected male rat treated with ciprofloxacin.

Methods: Seventy two male Wistar rats were randomly divided in to 9 groups. The groups were treated with the following medications for ۱۲ days: (۱) control (no medication), (۲) sham (normal saline injection into vas deferens and orally administration of PBS), (۳) ginseng, (۴) ciprofloxacin, (۵) ciprofloxacin and ginseng, (۶) UPEC (uropathogenic *E.coli*), (۷) UPEC and ginseng, (۸) UPEC and ciprofloxacin, (۹) UPEC, ginseng and ciprofloxacin. Fourteen days after last injection, rats were killed then prostate and epididymis were removed. After preparing samples, routine histology was performed using hematoxylin and eosin staining. The TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling) method was used to demonstrate apoptotic cells. Data analysis was performed using one-way ANOVA.

Results: According to our results, epididymis epithelial height and tubular diameter and also severity scores for prostate and epididymis inflammation of UPEC group respectively decreased and increased significantly compared to control group. Ciprofloxacin treatment of infected rats indicate significant reduction in epididymis epithelial height compared to control, but did not show any significant difference in evaluation of inflammation grade compared to UPEC group. Ginseng injection to UPEC+ciprofloxacin rats caused significant increase in epididymis

epithelial height and also significant reduction in inflammation grade of prostate and epididymis compared to infected group. Apoptosis results showed significant increased number of apoptotic cells in ciprofloxacin, UPEC and UPEC+ciprofloxacin groups compared to control one. Apoptosis reduction in UPEC+ciprofloxacin+ginseng group in comparison with UPEC one was significant, too. In all evaluations, $P < 0.05$ was considered significant.

Conclusion: These results suggest that ginseng may be an effective material in ciprofloxacin treatment of male genitourinary tract infection. Combination use of ginseng and ciprofloxacin is more effective than single use of each one.

Key words: prostate, epididymis, infection, ciprofloxacin, Ginseng